

TESIS DOCTORAL

PAPEL DE LA PROTEÍNA CRB2
DVRANTE LA POLARIZACIÓN,
DIFERENCIACIÓN Y MADUREZ
DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE
LA RETINA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y
PATOLOGÍA

ANTONIO ESCUDERO PANIAGVA
SALAMANCA, 2016



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Papel de la proteína CRB2 durante la polarización, diferenciación y madurez del epitelio pigmentario de la retina

Memoria de Tesis Doctoral presentada por
Antonio Escudero Paniagua
para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Salamanca con mención de
“Doctorado Internacional”

Departamento de Biología Celular y Patología

Dirigida por la Prof. Dra. D^a María Concepción Lillo Delgado

Salamanca, junio 2016

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN
M^a CONCEPCIÓN LILLO DELGADO
INCyL – C/ Pintor Fernando Delgado, 1
E-37007 Salamanca (España/Spain)
Tel: +34 923 294500 ext. 5334 · Fax: +34 923 294750

Salamanca, 15 de junio de 2016

D^a María Concepción Lillo Delgado, Profesora Titular de Biología Celular

HACE CONSTAR:

QUE la Tesis Doctoral titulada “Papel de la proteína CRB2 durante la polarización, diferenciación y madurez del epitelio pigmentario de la retina”, ha sido realizada por el licenciado en Biología D. Antonio Escudero Paniagua en el departamento de Biología Celular y Patología y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

QUE ha sido desarrollado bajo mi dirección y dentro del programa de doctorado en *Neurociencias* de nuestra Universidad.

QUE, en mi opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales, y por tanto, autorizo la defensa de la Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca con mención de “Doctorado Internacional”.

Para que así conste, lo firmo en Salamanca, a 16 de junio de 2016,

La directora



Fdo.: M^a Concepción Lillo Delgado

Índice

Introducción	3
1. La célula epitelial polarizada	3
1.1 Uniones celulares apicolaterales	3
1.2 Estado quiescente	8
1.3 Especialización de membranas	9
1.4 Organización del citoesqueleto y distribución asimétrica de orgánulos	9
2. Los complejos de polaridad celular	10
2.1 El complejo Scrib	12
2.2 El complejo Par	14
2.3 El complejo Crb	17
3. La retina de mamíferos	20
3.1 El epitelio pigmentario	21
3.2 La retina neural	22
4. Los complejos de polaridad en la retina	24
5. Enfermedades degenerativas de la retina	25
5.1 Retinosis pigmentaria	25
5.2 Amaurosis congénita de Leber	26
5.3 Degeneración macular asociada a la edad	27
Justificación, hipótesis y objetivos	31
Materiales y Métodos	35
1. Animales de experimentación	35
2. Cultivos celulares	35
2.1 Clonetics™ Human RPE (ChRPE) cells	35
2.2 Human embryonic kidney (HEK) 293 y HEK293FT	35
2.3 Neuro-2A (N2A)	36
3. Generación y amplificación de plásmidos	36
4. Transfección de cultivos celulares	38
4.1 Lipofectamina LTX	38

4.2	Fosfato cálcico	39
5.	Generación de partículas lentivirales e infección de células ChrPE	39
6.	Medición de resistencia eléctrica transepitelial (TER)	40
7.	Producción de anticuerpos	40
8.	Reverse transcription (RT)-PCR	40
9.	Western blot	43
10.	Inyecciones subretinales	46
11.	Inmunofluorescencia	46
11.1	Preparación de criosecciones	47
11.2	Preparación de <i>Flat mounts</i> de epitelio pigmentario	47
11.3	Preparación de cultivos celulares	48
12.	Microscopía electrónica	49
13.	Obtención y análisis de imágenes	50
13.1	Fotografías de fluorescencia	50
13.2	Microrgrafías de microscopía electrónica	51
14.	Análisis estadísticos	51
Resultados		55
1.	CRB2 se localiza en las uniones ocluyentes del epitelio pigmentario	55
1.1	Análisis de la expresión de los mRNA de las isoformas CRB en el epitelio pigmentario	55
1.2	Caracterización del anticuerpo dirigido contra CRB2	55
1.3	Detección de CRB2 en el epitelio pigmentario	56
1.4	Localización subcelular de CRB2 en el epitelio pigmentario	58
2.	CRB2 concluye el proceso de polarización y diferenciación en células de epitelio pigmentario humanas	60
2.1	Caracterización del proceso de diferenciación y polarización de las células ChrPE en cultivo	60
2.2	Estudio de la formación de los complejos de polaridad apical Par y Crb durante el proceso de diferenciación y polarización de las células ChrPE	66
2.3	Análisis de los efectos del silenciamiento de CRB2 sobre la diferenciación y polarización de las células ChrPE	68

3. CRB2 es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis del epitelio pigmentario	73
3.1 Análisis de la efectividad del método de silenciamiento	73
3.2 Estudio de los efectos del silenciamiento de CRB2 en el epitelio pigmentario	73
3.3 Análisis de los efectos del silenciamiento de CRB2 en la homeostasis de la retina	75
Discusión	81
1. La expresión de CRB2 en el epitelio pigmentario	82
1.1 La expresión dependiente de tejido de las isoformas Crb	82
1.2 La detección de CRB2 en el epitelio pigmentario	82
1.3 La localización de CRB2 en el epitelio pigmentario	83
2. Las células ChrPE: Un nuevo modelo para el estudio <i>in vitro</i> del epitelio pigmentario	84
2.1 Modelos de cultivo para el estudio de la polaridad apicobasal y del epitelio pigmentario	85
2.2 El fenotipo epitelial de las células ChrPE en cultivo	86
3. El patrón de expresión y localización de las proteínas de polaridad apical durante el proceso de polarización epitelial	87
3.1 La formación de las uniones celulares durante el proceso de polarización	87
3.2 La formación del complejo Par durante el proceso de polarización	88
3.3 La formación del complejo Crb durante el proceso de polarización	89
4. La función de CRB2 durante el proceso de polarización apicobasal	91
5. Las consecuencias biológicas del silenciamiento de CRB2 en el epitelio pigmentario <i>in vivo</i>	95
Conclusiones	101
Bibliografía	105
English summary	129
1. CRB2 expression and localization in the RPE	129
2. The role of CRB2 in the RPE	141
3. Conclusions	175

Introducción

1. La célula epitelial polarizada

La polaridad celular es una propiedad que presentan multitud de tipos celulares durante diferentes etapas de su ciclo vital, que se caracteriza por la distribución asimétrica de moléculas, estructuras y orgánulos en la célula, y que conlleva una asimetría en su forma y, por lo tanto, también en sus funciones¹. La polaridad celular es imprescindible para el correcto desarrollo de multitud de procesos celulares como: la gemación en levaduras, la división celular, la formación de axones y dendritas neuronales, el transporte transepitelial, el desplazamiento celular o la extravasación linfocitaria^{2,3,4}.

El tejido epitelial es un tejido avascular, sin apenas matriz intercelular, formado por un tipo celular altamente polarizado que son las células epiteliales. Según la función principal que desempeña se clasifica en: epitelio de revestimiento, si actúa como barrera fisicoquímica selectiva proporcionando protección a otros tejidos, o epitelio glandular, si está especializado en la secreción de sustancias. Los epitelios de revestimiento están ampliamente distribuidos en los organismos pluricelulares y se encuentran limitando la periferia de muchos órganos y revistiendo conductos, de forma que suelen estar en contacto con ambientes fisicoquímicamente muy diferentes en cada uno de sus lados. Por este motivo las células epiteliales presentan un tipo de polaridad denominada apicobasal, en la que su membrana plasmática se diferencia y especializa en dos porciones o caras: una cara distal o apical, que generalmente representa una superficie libre, y otra proximal o basal, sobre la que se asienta el epitelio en la lámina basal. De esta manera la célula epitelial polarizada presenta un conjunto de características asimétricas propias que permiten diferenciarla de otras células polarizadas o sin polarizar⁵.

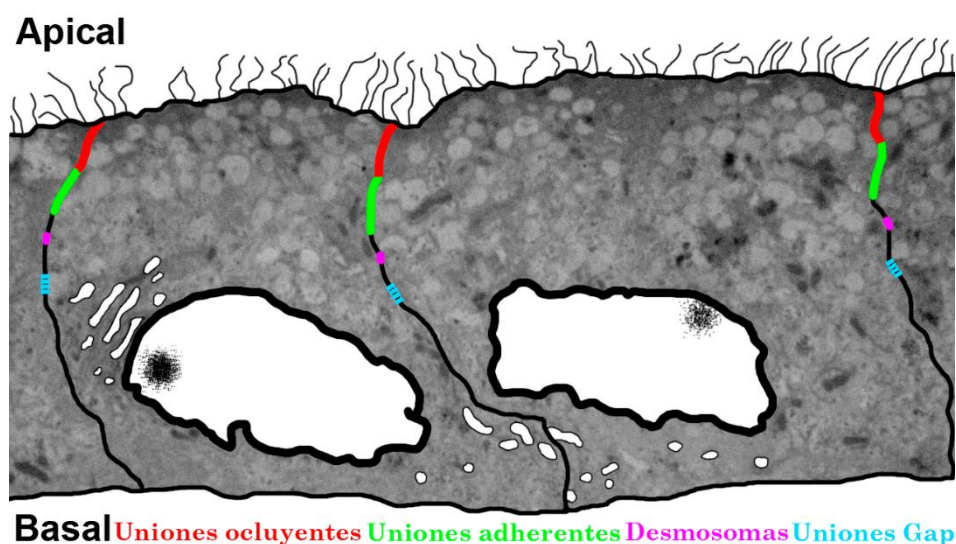
1.1 Uniones celulares apicolaterales

Una de las principales características de las células epiteliales es su capacidad para establecer uniones celulares estrechas con células vecinas. La existencia de este tipo de uniones se conoce desde hace más de un siglo⁶, pero fue en 1963 cuando Marilyn Farquhar y George Palade describieron la presencia de “una estructura tripartita en la membrana apicolateral de diferentes epitelios que produce el acercamiento de las membranas

Introducción

plasmáticas de las dos células y, en algunos puntos, llega casi a cerrar por completo el espacio intercelular⁷. Gracias a la observación y al análisis de estas estructuras a microscopía electrónica, a las que llamaron complejo de unión, se pudieron postular dos de sus principales funciones: la de proporcionar la fuerza necesaria para la formación de la barrera mecánica que constituye el epitelio, y la formación de una barrera bioquímica selectiva al transporte paracelular de moléculas e iones. Hoy en día sabemos que este tipo de estructuras son, además, fundamentales para el establecimiento de una comunicación intercelular y para la regulación de procesos fisiológicos en la propia célula, como la morfogénesis, la proliferación y la diferenciación celular⁸.

Atendiendo a la función que desempeñan y a su composición bioquímica, en vertebrados, podemos distinguir los siguientes tipos de uniones celulares localizadas de una posición más basal a apical (**Esquema 1**):



Esquema 1. Diseño esquemático de una monocapa de células epiteliales polarizadas con su cara apical situada hacia la zona superior de la imagen y la basal hacia la inferior, donde se ha señalado la posición relativa de las uniones celulares ocluyentes (en rojo), adherentes (en verde), Gap (magenta) y los desmosomas (azul) en la membrana apicolateral.

1.1.1 Uniones Gap

Su función principal es el acoplamiento eléctrico y metabólico de dos células vecinas mediante la formación de un canal entre ambas que pone en contacto directo su citoplasma, y a través del cual se permite el intercambio regulado de iones y pequeñas moléculas hidrosolubles. Están formadas por un único tipo de proteínas, las conexinas, que presentan cuatro pasos transmembrana y que se agrupan en hexámeros para formar un conexón o hemicanal, de modo que la unión de dos conexones de células vecinas forma el canal o unión

Gap⁹. Además, las conexinas, mediante la unión a proteínas señalizadoras, también regulan rutas de señalización intracelular y están implicadas en procesos como la proliferación o la muerte celular¹⁰.

1.1.2 Desmosomas

Son uniones celulares dependientes de Ca^{2+} extracelular cuya función principal es proporcionar resistencia a la tracción mediante el anclaje y coordinación del citoesqueleto de filamentos intermedios en células adyacentes. Los desmosomas tienen una distribución localizada en puntos a lo largo de la membrana apicolateral y están formados típicamente por proteínas transmembrana de la superfamilia de las cadherinas, proteínas citoplasmáticas de la familia Armadillo, y por la proteína adaptadora al citoesqueleto de filamentos intermedios Desmoplaquina. Además de estas proteínas, que forman la estructura básica de los desmosomas, existen un gran número de proteínas señalizadoras asociadas que regulan el estado fisiológico de la célula. En algunos casos, este tipo de uniones se forman en la cara basal, anclando la célula a proteínas de la matriz extracelular, en lo que se conoce como hemidesmosomas, ya que solo intervienen las proteínas de una sola célula^{11, 12}.

1.1.3 Uniones adherentes

Estas uniones celulares no son directamente dependientes de Ca^{2+} extracelular, y su función principal es la de proporcionar resistencia a la tracción mediante el anclaje y la coordinación del citoesqueleto de Actina de células adyacentes. En las células epiteliales polarizadas las uniones adherentes rodean el perímetro celular formando una estructura llamada zónula adherente. A estas uniones se ancla el citoesqueleto formado por microfilamentos de Actina (F-Actina), que se dispone en haces paralelos a la membrana plasmática adquiriendo una disposición característica de este tipo celular conocida como cinturón de Actina.

Las uniones adherentes están formadas por dos complejos proteicos: el formado por la unión de Nectina y Afadina, que es independiente de Ca^{2+} extracelular, y el formado por la unión de Cadherina y Catenina, dependiente de Ca^{2+} extracelular¹³. Las Nectinas son proteínas transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se unen por su dominio citoplasmático a la Afadina, una proteína con capacidad de unión a Actina, y que parecen responsables del inicio del reclutamiento del resto de proteínas de las uniones celulares a la membrana plasmática¹⁴. Las Cadherinas son proteínas transmembrana de un solo paso compuestas por: un dominio extracelular, que en presencia de iones Ca^{2+} sufre un

cambio conformacional que le aporta rigidez y la capacidad de unirse a Cadherinas de la célula vecina, y un dominio citoplasmático, mediante el cual se une, entre otras proteínas, a las Cateninas p120, α -catenina y β -catenina, que regulan la señalización intracelular proveniente de este tipo de uniones.

Las uniones adherentes están presentes en muchos tipos celulares, a veces como contactos esporádicos y otras de forma estable, pero siempre como estructuras dinámicas a través de las cuales se ejerce una doble función, la de unir y coordinar físicamente células vecinas así como la de regular y coordinar su fisiología¹⁵.

1.1.4 Uniones ocluyentes

Son uniones celulares no dependientes de Ca^{2+} extracelular cuya función principal es la de formar una barrera bioquímica selectiva al paso de iones y moléculas a través del espacio paracelular. Al igual que las uniones adherentes, en las células epiteliales polarizadas se disponen formando un cinturón alrededor de la membrana plasmática llamada zónula ocluyente pero, a diferencia de esta otra, la zónula ocluyente cierra casi por completo el espacio intercelular. Ningún componente del citoesqueleto está específicamente anclado a este tipo de uniones, aunque tanto los filamentos de Actina como los microtúbulos son capaces de unirse a varias proteínas de las uniones ocluyentes.

Las uniones ocluyentes están compuestas por las proteínas transmembrana de la familia de las Claudinas, TAMPs (Tight Junction-Associated Marvel domain-containing proteins) y JAMs (Junctional Adhesion Molecules), y las proteínas citoplasmáticas ZO-(1-3), además de numerosas proteínas adaptadoras y señalizadoras. Las Claudinas son una familia de proteínas cuya principal función es sellar el espacio paracelular y proporcionar selectividad al paso de iones¹⁶. La TAMPs son una familia de proteínas entre las que se encuentran las proteínas Ocludina, Tricelulina y MarvelD3, que regulan la estructura y la estabilización de las uniones ocluyentes, aunque de un modo aún desconocido¹⁷. Las JAMs pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, e intervienen en la adhesión y en la señalización intracelular¹⁸. Las proteínas ZO-(1-3) son proteínas citoplasmáticas de andamiaje capaces de poner en contacto a Claudina, Ocludina y JAM con los filamentos de Actina, además de unirse a la proteína Cingulina, que a su vez se une a los microtúbulos, de forma que ponen en contacto y coordinan a las uniones ocluyentes con el citoesqueleto de Actina y microtúbulos¹⁹. ZO-1 fue la primera proteína identificada como propia de las uniones ocluyentes²⁰, aunque posteriormente se observó que se integra en las uniones adherentes de forma previa a la formación de las uniones ocluyentes²¹. En este tipo de uniones también

podemos encontrar a la proteína Afadina que, como mencionamos anteriormente, también forma parte de las uniones adherentes, y que ayuda a la formación de las uniones ocluyentes durante los primeros estadios²².

1.1.5 Formación de los complejos de unión

La formación de los complejos de unión es un proceso ordenado y altamente regulado, que transcurre de forma coordinada con la aparición del resto de características de las células epiteliales polarizadas. Sin embargo, aunque se conocen muchas de las proteínas, y sus interacciones, que intervienen en este proceso, el mecanismo completo por el cual estos se forman aún no está del todo descrito. Además, muchas de las proteínas forman parte de distintos tipos de uniones en diferentes momentos del proceso, lo que dificulta significativamente su investigación. Debemos también tener en cuenta que los estudios no siempre se han realizado en el mismo tipo celular, por lo que es difícil deducir un modelo general, si es que existe, que explique este proceso.

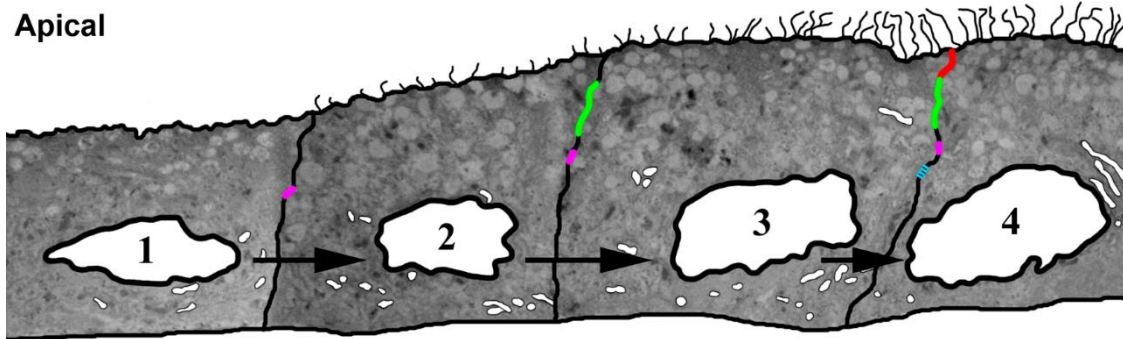
A pesar de estas dificultades, parece generalmente aceptado que las primeras uniones que se establecen son las adherentes y los desmosomas. Ambos tipos comparten proteínas molecularmente muy parecidas, filogenéticamente muy próximas, por lo que el proceso de formación es similar⁸. El proceso comienza con la unión entre Nectinas de dos células vecinas, que rápidamente son capaces de atraer a la membrana plasmática a los complejos formados por las Cadherinas²³, que son constantemente sintetizadas por la célula^{22, 23} y transportadas en vesículas a la membrana plasmática²⁴. Al producirse el contacto entre Cadherinas de dos células vecinas en presencia de Ca^{2+} extracelular estas se unen fuertemente y las Cateninas estabilizan el complejo anclándolo al citoesqueleto²⁵. A partir de este momento la unión adherente comienza a crecer y, dado el caso, comienza la formación de la unión ocluyente. Esta se inicia con la llegada de las proteínas JAM²⁶ y ZO-1²⁷ a la uniones adherentes, que posteriormente se segregan hacia la zona apical^{21, 28}, favoreciendo la integración de Claudina primero, y Ocludina después, así como del resto de proteínas citoplasmáticas de estas uniones²⁹.

Por lo tanto, podemos distinguir tres fases en el proceso de formación de los complejos de unión (**Esquema 2**): una primera fase de establecimiento de uniones puntuales con proteínas propias de las adherentes y desmosomas en la que se produce la llegada y estabilización de las proteínas de estas uniones y su anclaje al citoesqueleto; seguida de una segunda fase de crecimiento de las uniones adherentes en la que, además, proteínas típicamente presentes en las uniones ocluyentes se integran en estas uniones; y una tercera

Introducción

fase de desarrollo o maduración, en la que se produce la separación de las uniones ocluyentes hacia la zona apical de las uniones adherentes promoviendo la formación de la zónula ocluyente.

Apical



Basal **Desmosomas** **Uniones adherentes** **Uniones Gap** **Uniones ocluyentes**

Esquema 2. Diseño esquemático del desarrollo temporal de diferentes estructuras durante la polarización apicobasal en las células epiteliales, donde se muestra como, en primer lugar se forman desmosomas entre células sin polarizar (1-2), seguida por la formación de las uniones adherentes en células que comienzan a polarizarse (2-3) y, finalmente, se forman las uniones ocluyentes y las uniones Gap en células con marcada polaridad apicobasal que presentan microvellosidades en su cara apical y el núcleo en la zona basal (3-4).

1.2 Estado quiescente

La formación, diferenciación y el mantenimiento del epitelio requiere un estricto control del ciclo celular de las células epiteliales que lo forman. Inicialmente, las células mesenquimales desdiferenciadas sufren numerosas divisiones celulares hasta llegar a cubrir todo el área donde se constituye el epitelio. A medida que las células ocupan toda la superficie las divisiones celulares cesan. Este proceso está controlado, en gran medida, por las uniones celulares, que al formarse regulan cascadas de señalización mediante el secuestro en el citoplasma de diversos factores de transcripción promotores de la división celular^{30, 31}. De esta manera, a medida que las células se polarizan y diferencian, pasan a un estado quiescente en fase G_0 ³². A este proceso se le conoce como transición mesénquima-epitelio o por sus siglas en inglés MET (mensenchymal to epithelial transition)³³.

Sin embargo, las células epiteliales quiescentes pueden volver a desdiferenciarse y entrar en división en lo que se conoce como transición epitelio-mesénquima o por sus siglas en inglés EMT (epithelial to mensenchymal transition). La EMT juega un papel fundamental en diferentes momentos del desarrollo embrionario, como la gastrulación o la delaminación de la cresta neural, pero también en el estado adulto, como cuando al producirse un daño en un epitelio, la muerte de algunas células provoca la rotura de la barrera, en ese momento gracias a la desdiferenciación y división de las células cercanas al daño se añaden nuevas

células al tejido y el epitelio es reparado³⁴. La EMT es, además, la causa de la aparición de numerosos tipos de carcinoma cuando ocurre de forma descontrolada³⁵.

1.3 Especialización de membranas

Una característica fundamental de las células epiteliales polarizadas es la especialización morfológica, bioquímica y funcional de cada una de sus caras, gracias a la distribución desigual de lípidos y proteínas en la membrana plasmática de cada una de ellas. Esto se consigue, entre otros procesos, mediante la regulación del tráfico proteico y vesicular desde el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático hacia cada una de las caras de la membrana plasmática^{36, 37, 38}. Además, las uniones ocluyentes actúan como barrera que impide la difusión de estas moléculas de una cara a otra a través de la membrana plasmática, manteniendo su composición específica³⁹. Es por ello que podemos distinguir una membrana apical, que abarca desde los complejos de unión hacia la cara apical de la célula, y una membrana basolateral, desde los complejos de unión hacia la zona basal. Es especialmente importante para el desarrollo de la función del epitelio la distribución desigual de canales iónicos y transportadores de moléculas en estas caras, que permiten el transporte selectivo unidireccional de estos a través de las células⁴⁰, así como la formación de estructuras especializadas como microvellosidades o cilios en la cara apical o el laberinto basal en la cara basal (**Esquema 2**).

1.4 Organización del citoesqueleto y distribución asimétrica de orgánulos

Como describimos anteriormente, la organización del citoesqueleto en la célula epitelial polarizada está altamente condicionada por la presencia de los complejos de unión. En estas células los filamentos de Actina se encuentran altamente concentrados en la cara apical, donde se anclan a las uniones adherentes formando el llamado cinturón de Actina, y donde ayudan a formar las microvellosidades⁴¹. Los filamentos intermedios, anclados a los desmosomas y hemidesmosomas se distribuyen por todo el citoplasma proporcionando resistencia mecánica y moldeando la forma de la célula epitelial⁴². Las células epiteliales polarizadas, además de los microtúbulos provenientes del centrosoma distribuidos por todo el citoplasma, presentan microtúbulos no centrosomales dispuestos en una red apical capaz de unirse a las uniones adherentes y ocluyentes, y en haces orientados de forma apicobasal, con su extremo “-“ hacia la zona apical y el extremo “+” hacia la cara basal, que permiten el transporte de vesículas y orgánulos en esta dirección^{19, 43}.

La organización del citoesqueleto influye en la localización asimétrica de moléculas y orgánulos necesaria para la polarización de funciones. En la célula epitelial polarizada el núcleo y las mitocondrias se localizan generalmente en zonas basales, mientras que el aparato de Golgi suele estar localizado junto a la zona apical del núcleo. Estructuras como los centriolos o el cuerpo basal también se encuentran polarizados y se localizan normalmente junto a la membrana apical⁴⁴ (**Esquema 2**).

2. Los complejos de polaridad celular

Las primeras moléculas capaces de dotar a la célula de polaridad fueron descubiertas en 1988 por Kemphues y Priess, que describieron cómo mutaciones independientes en cuatro genes del nematodo *Caenorhabditis elegans* alteraban su desarrollo embrionario al producirse un fallo en la distribución de los determinantes maternos en las primeras divisiones celulares⁴⁵. Debido al fenotipo que presentaban los embriones mutantes, a estos genes se les denominó “par1-4” de la abreviatura en inglés de *partitioning defective*. Posteriormente, y utilizando este mismo modelo, se descubrieron nuevas proteínas que regulaban de forma interdependiente este proceso^{46, 47}. De esta manera se llegó a caracterizar un complejo proteico formado por las proteínas Par3, Par6 y aPKC capaz de dotar de polaridad anteroposterior al cigoto de *C. elegans* al que se denominó complejo Par⁴⁸.

El descubrimiento de un segundo grupo de proteínas necesarias para el establecimiento de la polaridad celular comenzó con un estudio de Tepass y Knust en 1990, donde describieron cómo mutaciones en el gen *crumbs* causaban la desorganización de la mayoría de los tejidos epiteliales durante el desarrollo embrionario de la mosca *Drosophila melanogaster*, e hipotetizaban sobre su posible función en el control de la polaridad celular⁴⁹. Posteriormente, describieron cómo mutaciones en el gen *stardust* de *D. melanogaster* (homólogo de *Pals1* en mamíferos) producían un fenotipo similar al de las moscas mutantes para el gen *crumbs*, lo que, junto a otros experimentos, les llevó a postular la acción conjunta de ambas proteínas en la determinación de la polaridad celular en las células epiteliales donde se coexpresan⁵⁰. Por último, se describió un tercer miembro, PATJ, capaz de unirse al resto de proteínas del complejo y también necesario para el establecimiento de la polaridad celular^{51, 52, 53}. Así quedó descrito el complejo Crb, formado por las proteínas Crumbs, Stardust/PALS1 y PATJ, como un segundo complejo proteico capaz de dotar de polaridad a las células donde se expresa.

Un tercer grupo de proteínas necesarias para el establecimiento de la polaridad celular fue descrito en el año 2000 por Bilder y Perrimon. Descubrieron que la proteína Scribble era necesaria para mantener la organización histológica de los epitelios de *D. melanogaster* durante su desarrollo embrionario, y que, además, ejercía su función mediante la restricción de la localización de Crumbs en la zona apical de la célula⁵⁴. Posteriormente, observaron que las proteínas Lgl y Dlg actuaban conjuntamente con Scribble en el desarrollo de sus funciones⁵⁵. De este modo quedó descrito un tercer complejo de polaridad celular, el complejo Scrib.

Por lo tanto, hasta la fecha se ha descrito la existencia de tres complejos proteicos que controlan el establecimiento de la polaridad celular, estos son: los complejos Par, Crb y Scrib. Mientras que, como hemos explicado, el complejo Par fue descubierto gracias al estudio de la división de células embrionarias de *C.elegans* que presentan una polaridad anteroposterior, los complejos Crb y Scrib fueron caracterizados mediante el estudio de células epiteliales de *D. melanogaster* que presentan polaridad apicobasal. Sin embargo, posteriormente se ha comprobado que los tres complejos se expresan conjuntamente en las células epiteliales, localizándose junto a la membrana plasmática e interaccionando para dotar de polaridad apicobasal a este tipo celular. Pero, mientras que los complejos Par y Crb se encuentran en la membrana apicolateral, el complejo Scrib está restringido a la cara basal. Teniendo en cuenta esta distribución y la relación que existe entre ellos, se ha determinado que los complejos Par y Crb están implicados en la especificación de la zona apical de la célula, mientras que el complejo Scrib determina la zona basal⁵⁶.

Debido a que estas proteínas fueron descubiertas al mismo tiempo en diferentes organismos y por diferentes grupos, la mayoría han recibido diferentes nombres que son simultáneamente utilizados en la literatura (**Tabla 1**). Especialmente difieren los nombres utilizados entre las proteínas de *D. melanogaster* y las de mamíferos. Además, en estos últimos, se han encontrado con posterioridad multitud de genes parálogos a los inicialmente descritos como ortólogos de los descubiertos en invertebrados que, en general, dan lugar a proteínas muy similares, pero que se expresan en diferentes tipos y/o estados celulares. Curiosamente, en la literatura científica los productos de algunos de estos genes parálogos han sido estudiados y son nombrados de forma totalmente independiente, como ocurre con las proteínas CRB que describimos a continuación. En otros casos, sin embargo, todos o varios de los productos son estudiados y/o nombrados de forma conjunta, como ocurre con las proteínas PAR3 (PAR3A, PAR3B), PAR6 (PAR6A-D) o aPKC/s (aPKC λ /t, aPKC ζ), quizás

Introducción

debido a que los genes parálogos han sido descubiertos recientemente, y también a que en muchos casos no se han encontrado diferencias en la función de estos productos. Esto último dificulta en gran medida la extracción de conclusiones sobre su función, ya que esta no solo depende del contexto experimental, sino de la isoforma que interviene en cada proceso. En cualquier caso, a continuación tendremos en cuenta la corriente general seguida hasta ahora por la comunidad científica a la hora de nombrar estas proteínas, basándonos en los estudios que se han realizado hasta el momento en modelos similares al que empleamos en el nuestro.

	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Mammals				
			Gene symbols	Human			
				Aliases and previous symbols	K location	Isoforms	MW (kDa) unprocessed
Par6/Par3/aPkc complex	DmPar6	—	<i>PARD6A</i>	PAR6; PAR6A; TIP40; PAR6α; PAR6C	16q22	2	37
		—	<i>PARD6B</i>	PAR6B	20q13	1	41
		Par-6	<i>PARD6G</i>	PAR6G; Par6γ; PAR6D	18q23	1	41
	Bazooka	—	<i>PARD3</i>	PAR3A; PAR3; PAR3α; ASIP; CTCL Tumor antigen se 2–5	10p11	10	180
		Par-3	<i>PARD3B</i>	PAR3β; PAR3L; ALS 2CR 19	2q33	5	140
	DmaPkc	PKC-3	<i>PRKCi</i>	PKCi; nPKC _i ; aPKC _u /λ; PRKC _u /λ	3q26	1	67
Crb/Pals/Patj complex	Crb	—	<i>PRKCz</i>	PKC2; nPKC _z	1p36	1	68
		Crb1	<i>CRB1</i>	RP12; LCA8	1q31–q32	4	154
		Eat-20	<i>CRB2</i>		9q33	3	134
		—	<i>CRB3</i>		19p13	2	13
		—	<i>MPP1</i>	EMP55	Xq28	1	52
	—	—	<i>MPP2</i>	DLG2	17q12–q21	3	65
		—	<i>MPP3</i>	DLG3	17q12–q21	1	66
		—	<i>MPP4</i>	DLG6	2q33	5	73
		Sdt	<i>MPP5</i>	Pals1	14q23	2	77
		C50F2.8	<i>MPP6</i>	Pals2; VAM-1; p55T	7p15	1	61
	Dpatj*	Y55B1BR.4	<i>MPP7</i>		10p12	1	65
		—	<i>INADL</i>	PATJ	1p31	5	196
		MPZ-1	<i>MPDZ</i>	MUPP1	9p24–p22	3	219
		LET-413	<i>SCRIB</i>	SCRIB1; CRIB1; Vartul; LAP4	8q24	4	175
		—	<i>DLG1</i>	SAP97; hDlg	3q29	7	100
Scrib/Dlg/Lgl complex	Scrib	—	<i>DLG2</i>	PSD-93; Chapsyn110	11q21	4	97
		—	<i>DLG3</i>	SAP102; NE-DLG	Xq13	1	90
		—	<i>DLG4</i>	PSD95; SAP90	17p13	2	80
		F44D12.1	<i>DLG5</i>	P-DLG	10q23	2	202
	Dlg	—	<i>LLGL1</i>	L2GL1; DLG4; HUGL1; LGL1	17p11	1	115
		—	<i>LLGL2</i>	L2GL2; HGL; LGL2	17q24–q25	3	113
		—					
		—					

Tabla 1. Tabla donde se indican los diferentes homólogos (ortólogos y parálogos) de los distintos genes de los tres complejos de polarización en *D. melanogaster*, *C. elegans*, y mamíferos, incluido el humano, así como los nombres alternativos, su localización cromosómica en el genoma humano, el número de isoformas previstas mediante *splicing* alternativo y su peso molecular estimado en kDa. Modificado de⁵⁶

2.1 El complejo Scrib

El complejo Scrib está compuesto por las proteínas citoplasmáticas SCRIB (Scribble homolog), DLG (Disks large homolog) y LGL (Lethal Giant Larvae homolog). La mayor parte de los estudios sobre estas proteínas han sido realizados en *D. melanogaster*, y a pesar de que las tres actúan en una ruta común, las interacciones directas entre ellas no han sido aún muy estudiadas. En células epiteliales, el complejo Scrib regula la formación de las uniones celulares y determina la zona basolateral mediante la exclusión de los componentes

apicolaterales de esta^{54, 57}. Los estudios realizados en células de mamíferos se han centrado sobre todo en su papel como supresores tumorales, ya que la disminución de su expresión está ligada a la progresión de tumores⁵⁸.

2.1.1 SCRIB

SCRIB, también conocida como Scribble en *D.melanogaster* y hScrib o Vartul en mamíferos (**Tabla 1**), es una proteína de andamiaje de la familia LAP (LRR and PDZ)⁵⁹, compuesta por dieciséis LRR (Leucine-Reach Repeats), mediante las cuales se une a la proteína de polaridad LGL2⁶⁰, dos dominios LAPSD (LAP-specific domain) y cuatro dominios PDZ (PSD-95, Dlg y ZO-1), dos de ellos de unión a ZO-2^{56, 61} (**Esquema 3**). En las células epiteliales Scrib es reclutada a las uniones adherentes mediante E-cadherina, siendo necesaria para la correcta formación de estas estructuras^{62, 63}. Es además considerada un supresor tumoral, ya que la disminución de los niveles de la proteína en distintos tipos epiteliales están relacionados con la aparición de tumores^{64, 65, 66, 67}.

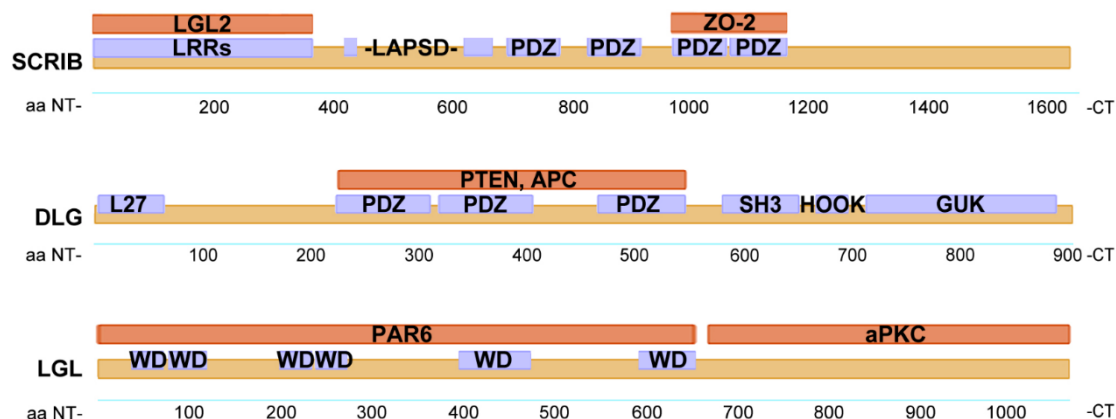
2.1.2 DLG

Las proteínas DLG son miembros de la familia MAGUK (membrane associated guanylate kinase), un grupo de proteínas que comparten una estructura básica compuesta por entre uno y tres dominios PDZ, un dominio SH3 (Src homology 3) y un dominio GUK (guanylate kinase), y que, a su vez, se divide en cuatro subfamilias clasificadas según la similitud de sus dominios⁶⁸ (**Esquema 3**). La subfamilia Dlg consta de cuatro genes, ortólogos del gen Dlg de *D.melanogaster*, que codifican para las proteínas DLG1-4⁵⁸ (**Tabla 1**). Interaccionan con la proteína LGL en su estado fosforilado⁶⁹ y también con los supresores tumorales APC⁷⁰ y PTEN⁷¹, siendo también considerada un supresor tumoral.

2.1.3 LGL

En mamíferos existen dos genes ortólogos del gen *Dlg* de *D.melanogaster* que codifican para las proteínas LGL1-2 también conocidas como L2GL(1-2) (**Tabla 1**). Están formadas por varios dominios WD40, cinco en el caso de LGL2 y seis en el de LGL1⁵⁶ (**Esquema 3**). En las primeras fases de la polarización, LGL se encuentra desfosforilada formando un complejo con PAR6-aPKC, e impidiendo la unión de estas dos proteínas con PAR3⁷². En etapas posteriores es fosforilada por aPKC lo que provoca su localización en la zona basal donde se une al complejo SCRIB-DLG^{69, 73, 74}. LGL es considerada un supresor tumoral, ya

que la alteración de sus niveles de expresión favorece la aparición y progresión de tumores^{75, 76}.



Esquema 3. Diseño esquemático de la estructura primaria de las proteínas del complejo Scrib (en marrón): SCRIB, DLG y LGL, en las que se indican sus dominios funcionales descritos (en azul) y algunas de sus principales proteínas de unión (en rojo).

2.2 El complejo Par

Las proteínas del complejo Par están muy conservadas en la evolución, desde invertebrados a mamíferos, y se expresan en numerosos tejidos y tipos celulares⁵⁶. En las células epiteliales es imprescindible para la determinación de la zona apical de la célula^{77, 78}, siendo necesario para el establecimiento y maduración de las uniones ocluyentes^{79, 80, 81}. Todas las proteínas del complejo son proteínas citoplasmáticas, y mantienen una relación interdependiente para su integración en las uniones celulares, donde desarrollan su función^{82, 83, 84}. Aunque el complejo es dinámico y se han descrito numerosas proteínas capaces de interactuar con él, normalmente se asocia con las proteínas PAR3 (Partitioning defective 3 homolog), PAR6 (Partitioning defective 6 homolog) y aPKC (atypical Protein Kinase C)⁸⁵.

2.2.1 PAR3

También conocida como Bazooka en *D. melanogaster* y PARD3 y ASIP en mamíferos, aunque estos últimos poseen dos genes parálogos *Par3a* y *Par3b* de los que resultan diferentes proteínas por *splicing* alternativo con pesos moleculares que van desde 100 a 180 kDa^{83, 86} (**Tabla 1**). Son proteínas de andamiaje compuestas por tres dominios PDZ (PSD95/Discs Large/ZO-1), uno de ellos de unión a PAR6⁸⁶ JAM²⁸ y Nectina⁸⁷ y diferentes dominios de unión a otras proteínas, entre las que se encuentra aPKC⁸⁴, aunque PAR3B ha perdido esta capacidad^{83, 88}, Tiam1⁸⁹ y la propia PAR3⁸⁰ (**Esquema 4**). Se ha comprobado que PAR3 es

imprescindible para la formación y el mantenimiento de las uniones ocluyentes mediante el reclutamiento del resto de proteínas del complejo a las mismas⁸⁰. Todas las proteínas PAR3 se localizan en las uniones celulares^{83, 84}; en un primer momento, durante la fase de crecimiento de las uniones adherentes gracias a su interacción con Nectina⁸⁷ y JAM^{28, 90}, durante la maduración de estas gracias a su autoagregación⁸⁰ y, una vez establecidas las uniones ocluyentes por la interacción con otras proteínas de estas uniones⁹¹.

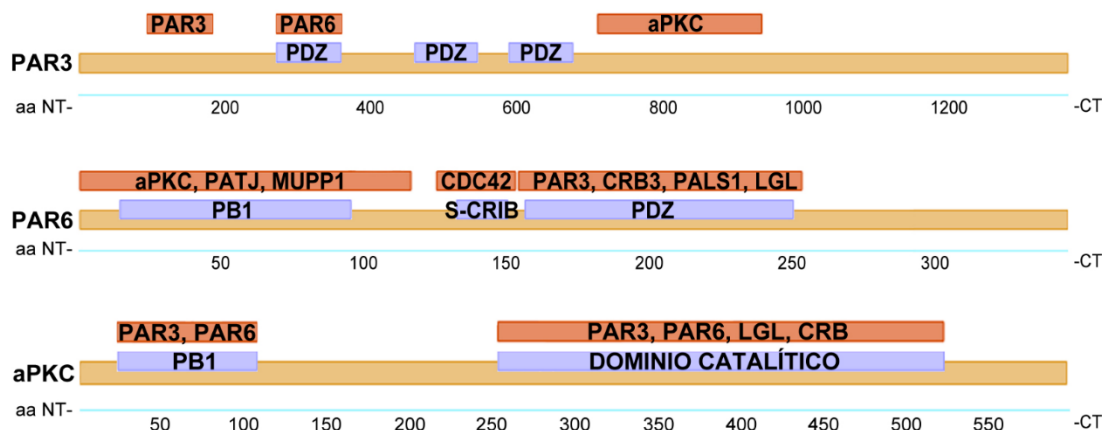
2.2.2 PAR6

También conocida como DmPar6 en *D. melanogaster* y PARD6 en mamíferos, aunque estos últimos poseen cuatro genes parálogos que codifican para las proteínas PAR6(A-C)^{79, 92} (**Tabla 1**). Son proteínas de andamiaje de 37 kDa compuestas por los dominios PB1 (Phox/Bem 1), de unión a aPKC⁸⁶, PATJ y MUPP1⁹³, semi-CRIB (Cdc42/Rac interactive binding), capaz de unirse a Cdc42/Rac1-GTP^{86, 92} y PDZ, de unión a PAR3A⁸⁶, CRB3⁹⁴, PALS1^{91, 95} y LGL⁷⁴ (**Esquema 4**). Aunque su función general es poner en contacto a Cdc42/Rac1-GTP y aPKC con PAR3^{79, 86}, LGL⁷⁴ o Crumbs⁹⁶ para su fosforilación, las distintas isoformas se diferencian por su capacidad de unión a estas proteínas y por su localización subcelular, lo que hace que cada una de ellas tenga un papel diferente en distintos momentos del proceso de polarización⁸². Se ha encontrado relacionada con la aparición de tumores en humanos, ya que regula también la proliferación en células epiteliales^{97, 98}.

2.2.3 aPKC

También conocida como PKC-3 en *C. elegans* y DmaPkc en *D. melanogaster*, los mamíferos poseen dos genes parálogos que codifican para las proteínas aPKC λ/ι y aPKC ζ (**Tabla 1**), que, a diferencia de las PKC clásicas y las nuevas no necesitan Ca²⁺ ni fosfolípidos para ser activadas⁹⁹. Ambas tienen un peso molecular de 75 kDa y están compuestas por un dominio PB1 de unión a PAR3 y PAR6, y un dominio catalítico con actividad Serina/Treonina kinasa capaz de fosforilar a las proteínas PAR3^{86, 100}, PAR6¹⁰¹, LGL⁷⁴ y Crumbs⁹⁶ (**Esquema 4**). Es la única proteína de los tres complejos de polaridad con actividad catalítica conocida, que es imprescindible para la formación de las uniones celulares⁸¹, y que está regulada por la

presencia en el complejo de las proteínas Cdc42 o Rac1 activas, es decir, unidas a GTP, algo que generalmente ocurre junto a la membrana plasmática^{102, 103}.



Esquema 4. Diseño esquemático de la estructura primaria de las proteínas del complejo Par (en marrón): PAR3, PAR6 y aPKC, en las que se indican sus dominios funcionales descritos (en azul) y algunas de sus principales proteínas de unión (en rojo).

2.2.4 Otras proteínas de unión al complejo: Cdc42 y Rac1

Se han descubierto numerosas proteínas capaces de interaccionar con las tres proteínas del complejo Par en diferentes contextos⁵⁶. Unas de ellas son las proteínas Cdc42 y Rac1, que en numerosos artículos las consideran un cuarto miembro del complejo, ya que son imprescindibles para regular la actividad de la aPKC, y por tanto la del complejo. Estas proteínas, con un peso molecular de entre 20 y 30 kDa, forman parte de las GTPasas pequeñas de la familia de Rho, y actúan como interruptores moleculares alternando entre una forma inactiva, cuando están unidas a GDP, y una forma activa, unidas a GTP. Intervienen en multitud de procesos celulares como en la organización del citoesqueleto, en la regulación del tráfico intracelular, en la regulación transcripcional, en el control del crecimiento celular y en el desarrollo^{104, 105, 106}. La unión al complejo Par ocurre a través del dominio semi-CRIB de la proteína PAR6 solo cuando se encuentran en su forma activa^{79, 107}, unida a GTP, lo que aumenta la afinidad de PAR6 por sus ligandos del dominio PDZ¹⁰⁸. En las uniones celulares de las células epiteliales existe un reservorio de estas proteínas en su estado activo¹⁰⁹, siendo capaces de favorecer la unión de PAR6 con sus ligandos a la vez que activa a la aPKC en este dominio celular.

2.3 El complejo Crb

Los miembros del complejo Crb son proteínas evolutivamente muy conservadas en el reino animal, desde esponjas a mamíferos^{110, 111}. En las células epiteliales el complejo Crb regula el establecimiento y mantenimiento de las uniones celulares, determinando la zona apical de la célula^{110, 112}. En este tipo celular se integra en las uniones celulares, donde interactúa con diferentes proteínas, incluidas las del complejo Par, aunque se considera que el complejo está formado por las proteínas CRB (Crumbs homolog), PALS1 (Protein Associated with Lin-7) y PATJ (Pals1-associated tight junction protein).

2.3.1 CRB

En *D. melanogaster* existe un solo gen que codifica para la proteína Crumbs⁴⁹, sin embargo los mamíferos tienen tres genes parálogos que codifican para las proteínas CRB1¹¹³, CRB2^{114, 115} y CRB3^{114, 116} (**Tabla 1**). Todas son proteínas transmembrana de un solo paso que contienen tres dominios funcionales: uno intracelular, transmembrana y otro extracelular¹¹⁰ (**Esquema 5**), aunque los genes *Crb1* y *Crb2* podrían generar también proteínas secretables sin el dominio intracelular^{113, 115, 117}.

Dominios funcionales

El dominio intracelular une a las proteínas CRB con el resto de miembros del complejo, y parece ser necesario y suficiente para el establecimiento y mantenimiento de las uniones celulares¹¹⁸. Este dominio contiene un sitio FDB (FERM (band 4.1-ezrin-radixin-moesin) domain binding), al que se unen las proteínas EHM2, EPB41L5^{119, 120} y Expanded¹²¹ y un sitio PDB (PDZ domain binding) en el extremo C-terminal, al que son capaces de unirse las proteínas PALS1^{52, 116} y PAR6⁹⁴, y que termina en una secuencia aminoacídica muy conservada en todas las proteínas CRB, la secuencia formada por los aminoácidos “ERLI”. Sin embargo, por medio de *splicing* alternativo del gen *Crb3* se pueden generar tanto la proteína CRB3A, terminada en la secuencia ERLI, como una isoforma diferente llamada CRB3B, cuya secuencia aminoacídica en el extremo C-terminal corresponde a los aminoácidos CLPI, que media la unión a importina β -1¹²². Las dos isoformas de CRB3 tienen además un sitio de unión a SH3 (Src homology type 3) rico en prolina entre los sitios FDB y PDB, que no se encuentran en CRB1 ni en CRB2¹²³, y cuya función y proteínas con las que puede interactuar aún se desconoce^{94, 123}.

El dominio transmembrana ancla la proteína y al resto del complejo a la membrana plasmática, lo que las convierte en las únicas proteínas de los tres complejos de polaridad

Introducción

con esta propiedad, y es capaz de inhibir funcionalmente al complejo gamma-secretasa^{124, 125}, encargado del procesamiento postraduccional de numerosas proteínas transmembrana¹²⁶.

El dominio extracelular, que puede ser glicosilado, está compuesto por numerosas repeticiones EGF-like y Laminina A/G, aunque CRB3 lo ha perdido casi en su totalidad^{116, 127}. Este dominio favorece la adhesión entre células mediante la formación de homodímeros de las proteínas CRB de células vecinas, al menos en *D. melanogaster* y en pez zebra (*Danio rerio*)^{128, 129}. Es capaz también de inhibir la señalización de la proteína Notch, probablemente mediante la interacción directa entre ambas, y posteriormente evitando su procesamiento por el complejo gamma-secretasa gracias al dominio transmembrana¹²⁴.

Expresión

Las isoformas CRB tienen una expresión dependiente de tejido encontrándose, generalmente, en tipos celulares epiteliales y sus derivados. CRB1 es la que tiene una expresión más restringida, expresándose principalmente en cerebro y retina¹¹³, CRB2 se expresa principalmente en cerebro, retina y riñón¹³⁰, y CRB3 es la más ampliamente distribuida, expresándose en prácticamente todos los tipos celulares epiteliales y sus derivados, incluida la retina^{94, 110}.

Función

La función de las proteínas CRB no ha sido igualmente abordada para todas ellas. La mayoría de los estudios han sido realizados inicialmente sobre la proteína Crumbs de *D. melanogaster*, donde es esencial para el mantenimiento de la polaridad apicobasal de las células epiteliales mediante la regulación de la formación de las uniones celulares y el desarrollo de su zona apical^{49, 131}, y también en la regulación del desarrollo y tamaño de varios órganos de la mosca^{132, 133}. Posteriormente se ha comprobado que en mamíferos las diferentes isoformas CRB regulan procesos similares con cada uno de sus dominios de forma más o menos independiente; la polaridad celular está regulada por el sitio PDB al que se anclan el resto de miembros del complejo¹³⁴, y la regulación del crecimiento y tamaño tisular está regulada mediante la modulación de las rutas de señalización Hippo, por medio del sitio FDB^{121, 132, 135, 136} y Notch, por los dominios transmembrana y extracelular^{124, 133}.

CRB1

A pesar de la gran similitud entre Crumbs y CRB1, aún se desconoce el mecanismo molecular por el que CRB1 actúa en las células de mamífero, aunque se sabe de su importancia debido a que mutaciones en el gen *Crb1* producen dos tipos de ceguera congénita en humanos: la retinosis pigmentaria y la amaurosis congénita de Leber^{113, 137}.

CRB2

En cuanto a CRB2, su estructura es muy similar la de CRB1, y se sabe que es esencial para el correcto desarrollo embrionario¹³⁸, habiéndose identificado mutaciones en el gen *Crb2* que causan diferentes síndromes prenatales en humanos¹³⁹, para la diferenciación neuronal¹⁴⁰ y para el mantenimiento de la homeostasis de la retina^{141, 142}, pero los mecanismos moleculares por los que actúa son también desconocidos.

CRB3

CRB3 es la proteína más estudiada de las tres isoformas CRB y la más diferente, ya que carece casi por completo del dominio extracelular. Es necesaria para el correcto desarrollo del embrión, ya que los ratones CRB3-KO mueren a los pocos minutos de nacer debido a estrés respiratorio^{143, 144}. En células epiteliales, la isoforma CRB3A es imprescindible para el establecimiento de la polaridad celular y la formación de uniones ocluyentes^{94, 123, 145, 146}, y la isoforma CRB3B regula los procesos de división celular y ciliogénesis^{122, 147}. Además, interviene en la inhibición de la división celular por contacto mediante la regulación de la ruta de señalización Hippo^{148, 149}, por lo que no resulta extraño que deficiencias en CRB3 estén relacionadas con la aparición de tumores^{150, 151}.

2.3.1 PALS1

Miembro de la familia MAGUK, también conocida como MPP5 (MAGUK p55 subfamily member 5) en mamíferos y como Stardust en *D. melanogaster* (**Tabla 1**), PALS1 está compuesta por un dominio U1 (unknown 1) de unión a PAR6^{91, 95}, dos dominios L27, el primero de unión a las proteínas del complejo Crb: PATJ y MUPP1^{52, 152}, y el segundo a Lin7¹⁵³; un dominio PDZ de unión a las proteínas CRB^{52, 116} que es reforzada con dominios SH3, HOOK, al que también se une la proteína EPB41L5¹²⁰, y GUK¹⁵⁴ (**Esquema 5**). PALS1 es esencial para el establecimiento de la polaridad apicobasal en diferentes tipos celulares^{155, 156, 157} y para la formación de las uniones celulares en células epiteliales mediante el reclutamiento de PAR6-aPKC y CRB a este tipo de uniones^{95, 158}.

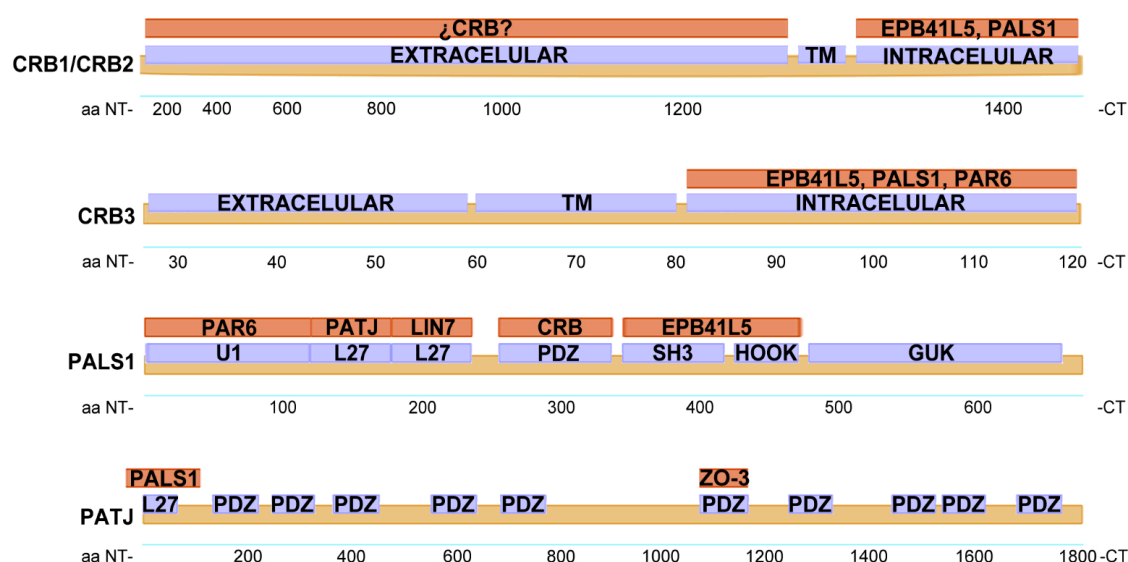
2.3.2 PATJ

En *D. melanogaster* existe un gen que codifica para la proteína dPatj, también conocida como Dlt (Disc lost), que es ortólogo de dos genes de mamíferos que codifican para las proteínas PATJ, también conocida como hINADL en humanos^{51, 53}, y MUPP1 (multi-PDZ domain protein-1)¹⁵⁹ (**Tabla 1**). Estas son proteínas de andamiaje con un dominio L27 de

Introducción

unión a PALS1⁵² y múltiples dominios PDZ (diez en el caso de PATJ y trece de MUPP1) de unión a diferentes proteínas, muchas de ellas componentes de las uniones ocluyentes como Claudina, JAM, PAR6 y ZO-3, y también a Nectina^{56, 93} (**Esquema 5**). Ambas isoformas compiten por la unión a PALS1, pero solo PATJ parece ser necesaria para la formación y el mantenimiento de las uniones ocluyentes^{152, 160}, siendo imprescindible para la localización de PALS1 en este tipo de uniones y para la posterior formación del complejo Crb⁹³.

Un gran número de estudios sobre las características y funciones de las proteínas del complejo CRB han sido realizados en la retina del ratón. En este tejido se encuentran expresados todos los miembros del complejo y la mayoría de sus isoformas hasta ahora descritas, siendo fundamentales para su formación y para el mantenimiento de la homeostasis de la misma.



Esquema 5. Diseño esquemático de la estructura primaria de las proteínas del complejo Crb (en marrón): CRB1-3, PALS1 y PATJ, en las que se indican sus dominios funcionales descritos (en azul) y algunas de sus principales proteínas de unión (en rojo). TM: transmembrana

3. La retina de mamíferos

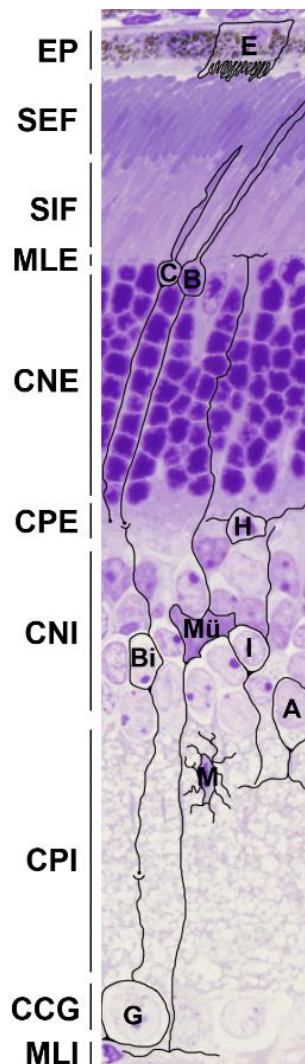
La retina es un órgano de vertebrados situado en la parte posterior del ojo encargado de la percepción y transformación de las señales luminosas en potenciales de acción, que son dirigidos al cerebro a través del nervio óptico para su procesamiento e interpretación. Es una estructura laminada compuesta por una parte neural, formada por neuronas y células gliales y una parte no neural formada por las células del epitelio pigmentario^{161, 162}. De esta manera, en la retina podemos diferenciar las siguientes capas y tipos celulares desde la zona más escleral o posterior hacia la zona más vitreal o anterior (**Esquema 6**):

3.1 El epitelio pigmentario

Es una monocapa de células epiteliales que recubre la parte posterior o escleral de la retina y que actúa como soporte físico, trófico y metabólico de los fotorreceptores, siendo imprescindible para el mantenimiento de la homeostasis de la retina neural. Las células de epitelio pigmentario están altamente polarizadas, encontrándose su lado apical, repleto de microvellosidades, en contacto con los segmentos externos de los fotorreceptores, y quedando entre ambos el conocido como espacio subretinal; y su lado basal en contacto con la membrana de Bruch, formada por la membrana basal del propio epitelio pigmentario y la membrana basal de las células endoteliales que se encuentran en el tejido conectivo adyacente llamado

coroides¹⁶³. Las funciones que desempeña el epitelio pigmentario dentro de la retina son las siguientes:

- Absorción del exceso de luz que atraviesa la retina gracias a los gránulos de melanina que contienen estas células y que les proporcionan pigmentación.
- Fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores y reciclaje de los pigmentos fotosensibles.
- Secreción de factores tróficos imprescindibles para el mantenimiento de los fotorreceptores y de la coroides.
- Formación de la barrera hematorretiniana mediante el cierre del transporte paracelular de grandes moléculas a través del epitelio.



Esquema 6. Diseño esquemático donde se resaltan los diferentes tipos celulares generales que forman la retina de mamíferos. Desde la zona escleral (margen superior) a la vitreal (margen inferior) encontramos señalados las siguientes capas y tipos celulares: EP- Epitelio Pigmentario, E- Célula de epitelio pigmentario, SEF- Segmentos externos de los fotorreceptores, SIF- Segmentos internos de los fotorreceptores, MLE- Membrana limitante externa, CNE- Capa nuclear externa, C- Cono, B- Bastón, CPE- Capa plexiforme externa, H- Célula horizontal, CNI- Capa nuclear interna, Bi- Célula bipolar, Mü- Célula de Müller, I- Célula interplexiforme, A- Célula amacrina, CPI- Capa plexiforme interna, M- Célula microglial, CCG- Capa de las células ganglionares, G- Célula ganglionar, MLI- Membrana limitante interna.

- Mantenimiento del equilibrio iónico y metabólico de los fotorreceptores gracias al transporte transcelular de moléculas e iones entre la retina neural y la sangre.

3.2 La retina neural

La retina neural está compuesta por tres tipos celulares: neuronas, células gliales y células endoteliales, que ocupan posiciones y desarrollan funciones diferentes dentro de la retina. Entre estos tipos encontramos:

3.2.1 Fotorreceptores

Son células fotosensibles capaces de transformar las señales luminosas en impulsos nerviosos¹⁶⁴. Se encuentran altamente polarizadas, presentando hacia su lado apical el segmento externo, donde se encuentran los pigmentos fotosensibles en unas estructuras formadas por apilamiento de membranas llamadas discos, y que está en contacto con las células de epitelio pigmentario. A continuación, hacia la zona basal, se encuentra el segmento interno, donde están la mayor parte de los orgánulos celulares encargados de la síntesis de proteínas y lípidos, así como las mitocondrias. Ambos segmentos están conectados mediante un cilio primario a través del cual se transportan las moléculas que viajan desde el segmento interno al externo y viceversa. A continuación se encuentra el cuerpo celular, donde está el núcleo del fotorreceptor, en la zona de la retina conocida como capa nuclear externa. En la zona más basal se encuentra el pie del fotorreceptor, el lugar donde se produce la sinapsis con neuronas de segundo orden en la conocida como capa plexiforme externa de la retina. La absorción de luz por parte de los pigmentos fotosensibles produce la hiperpolarización del fotorreceptor y la detención de la liberación de glutamato por su terminal sináptico, lo que impide la excitación de las neuronas de segundo orden. En la retina de vertebrados existen, al menos, dos tipos distintos de fotorreceptores, los conos y los bastones, que se diferencian morfológica y bioquímicamente para la captación de diferentes longitudes de onda de la luz⁵.

3.2.2. Neuronas de segundo orden

En contacto sináptico con los fotorreceptores encontramos: las células bipolares, que tienen su cuerpo celular en la capa nuclear interna y que a su vez hacen contacto y transmiten el impulso nervioso a las células ganglionares y amacrinas en la capa plexiforme interna¹⁶⁵; y las células horizontales, que tiene su soma en la capa nuclear interna y que modulan la actividad de los fotorreceptores¹⁶⁶. Las células interplexiformes tienen su cuerpo celular en

la capa nuclear interna y regulan la transmisión del impulso nervioso entre las dos capas plexiformes. Las células amacrinas tienen su cuerpo celular en la capa nuclear interna y establecen sinapsis con las células ganglionares en la capa plexiforme interna regulando la actividad de estas¹⁶⁷. Las células ganglionares tienen el soma en la capa de células ganglionares y envían sus axones conjuntamente empaquetados en una capa de fibras que forma el nervio óptico, y que proyecta a centros superiores del sistema nervioso central¹⁶⁸.

3.2.3 Células de la glía

Junto a los distintos tipos neuronales se encuentran tres tipos diferentes de células gliales que, de forma general, actúan como soporte físico, metabólico y protector de la actividad de las neuronas, manteniendo la homeostasis de la retina.

Uno de ellos son las células de Müller, que conforman la guía radial de la retina y actúan como soporte físico, trófico y metabólico de la retina neural. Su cuerpo celular se localiza en la capa nuclear interna, y extienden prolongaciones hasta los segmentos internos de los fotorreceptores, con los que se unen mediante uniones adherentes formando la denominada membrana limitante externa, y mediante proteínas generalmente presentes en las uniones ocluyentes formando la denominada región subapical de la membrana limitante externa, y hasta la capa de células ganglionares, formando la membrana limitante interna en la zona más vitreal de la retina¹⁶⁹. Existe un segundo tipo de célula glial que son los astrocitos, que en la retina se localizan de forma casi exclusiva en la capa de fibras del nervio óptico, y actúan como soporte físico, trófico y metabólico de la zona vitreal de la retina¹⁷⁰.

El tercer tipo son las células de la microglía, que son células del sistema inmune que constituyen la población de macrófagos residentes en el sistema nervioso¹⁷¹. Aunque su origen embrionario es aún controvertido, según la hipótesis más aceptada migran a la retina desde los vasos sanguíneos durante el desarrollo de esta y se distribuyen por la capa de células ganglionares y las capas plexiformes durante la etapa adulta, manteniéndose la población generalmente estable^{172, 173}. Ejercen un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la retina mediante la limpieza de desechos metabólicos, la remodelación sináptica, la liberación de factores tróficos y la protección ante el daño físicoquímico o biológico¹⁷². Fenotípicamente se distinguen dos tipos principales de células microgliales, aunque se han descrito numerosos estadios intermedios, que desempeñan diferentes funciones dependiendo del estado general de la retina. Así, en un estado fisiológico normal, las células microgliales se encuentran en estado no fagocítico, quiescente o en reposo, y presentan una forma ramificada con numerosos procesos, actuando como sensor del estado

fisiológico de la retina. Al detectar un daño, estas células pasan a un estado activado fagocítico o reactivo con una forma ameboide, que es capaz de migrar a las zonas dañadas de la retina y donde puede desempeñar una actividad citotóxica o neuroprotectora, dependiendo del tipo de daño que encuentre¹⁷⁴.

3.2.4 Células endoteliales

La retina es un tejido vascularizado por tres redes interconectadas de vasos sanguíneos localizadas en la capa de fibras del nervio óptico y las dos capas plexiformes, así como por la red de vasos sanguíneos situada en la coroides que está en contacto con la zona basal del epitelio pigmentario. Su desarrollo se produce gracias a la señalización que ejercen los diferentes tipos celulares de la retina y su estado, dinámico, cambia conjuntamente con el de la retina¹⁷⁵.

4. Los complejos de polaridad en la retina

En la retina existen varios tipos celulares con una marcada polarización apicobasal, por eso no es de extrañar que las proteínas de los complejos de polaridad se expresen en estas células y en aquellas regiones donde, además, se establecen uniones celulares estables^{176, 177, 178}. Sin embargo, la abundancia de estudios sobre estas proteínas en la retina es muy desigual, conociéndose mucho mejor la expresión y función del complejo Crb respecto a los otros dos complejos de polaridad.

Las proteínas del complejo Scrib se expresan principalmente en neuronas de varias capas de la retina, coincidiendo las tres en la capa plexiforme externa, en los segmentos internos de los fotorreceptores y también en el epitelio pigmentario^{176, 179}, pero se desconoce aún su papel en estos tejidos.

Las tres proteínas del complejo PAR, así como Cdc42 y Rac1, se localizan en la membrana limitante externa de la retina neural y en las uniones celulares del epitelio pigmentario, siendo necesarias durante el desarrollo embrionario para la correcta formación de la retina^{180, 181 107, 141, 182, 183}.

Todos los miembros del complejo Crb se localizan en la región subapical de la membrana limitante externa¹⁸⁴. La proteína CRB3 se ha detectado además en el cilio de conexión y en los pies sinápticos de los fotorreceptores, así como en las sinapsis de las células bipolares y amacrinas¹⁸⁵. En el epitelio pigmentario se ha detectado la expresión de PALS1¹⁵⁷, PATJ¹⁸⁴, MPP1¹⁸⁶ y EPB41L5¹²⁰, y el RNA mensajero (mRNA) de CRB2¹³⁰, pero hasta el

momento no se había descrito la expresión de ninguna de las proteínas CRB. Desde que en 1999 den Hollander y colaboradores descubrieron que mutaciones en el gen *CRB1* eran causantes de dos tipos de degeneración retiniana en humanos llamadas retinosis pigmentaria¹¹³ y amaurosis congénita de Leber¹³⁷, numerosos estudios han corroborado la importancia de las proteínas *CRB1*, *CRB2* y *PALS1* para el correcto desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis de la retina neural del ratón^{130, 141, 142, 157, 178, 184, 187, 188, 189, 190, 191}, aunque aún se desconoce el papel de *CRB3* y *PATJ* en este tejido, así como la del conjunto de proteínas del complejo en el epitelio pigmentario¹⁹².

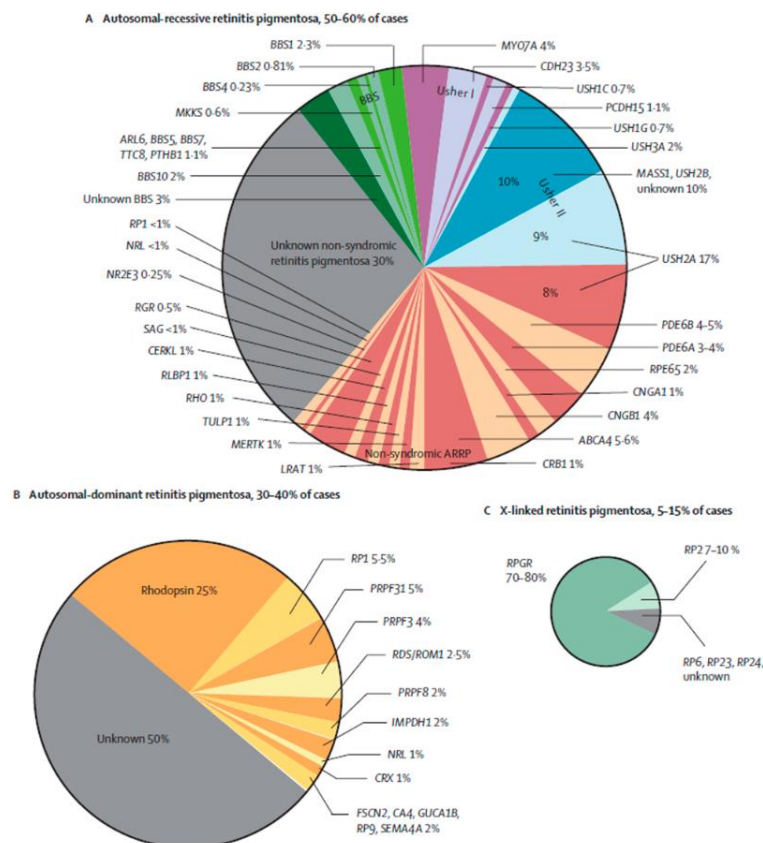
5. Enfermedades degenerativas de la retina

Las enfermedades degenerativas de la retina son el tipo de neurodegeneración con mayor prevalencia en el mundo, y suponen una de las dolencias más extendidas entre las personas de edad avanzada¹⁹³. En ellas, de forma general, se produce la degeneración de los fotorreceptores, que comienza con la desorganización de sus sinapsis y con la formación de nuevos contactos, produciéndose a menudo la deslocalización de la rodopsina¹⁹⁴. Conjuntamente, las células de la microglía se activan y acuden al lugar del daño, donde comienzan a secretar factores tróficos. Las células de Müller, por su parte, se vuelven reactivas e intentan sellar la zona de daño para reducir así su propagación a otras zonas¹⁹⁴. Este proceso puede extenderse durante años, pero, paulatinamente, los fotorreceptores mueren y en consecuencia se pierde la capacidad visual.

Existe un gran número de variantes genéticas que afectan al estado de los distintos tipos celulares de la retina, incluidas las células de epitelio pigmentario, y que son causantes de diferentes tipos de degeneración; pero, aún hoy en día, gran parte de las causas genéticas de muchas de ellas se desconocen. Unas de las mutaciones más conocidas son las que afectan al gen *CRB1*, que están directamente relacionados con la aparición de retinosis pigmentaria y de amaurosis congénita de Leber en humanos^{113, 137}.

5.1 Retinosis pigmentaria

La retinosis pigmentaria es un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas humanas en las que se produce la degeneración de los fotorreceptores. Inicialmente se produce la pérdida de bastones y posteriormente la de conos, además de alteraciones en el epitelio

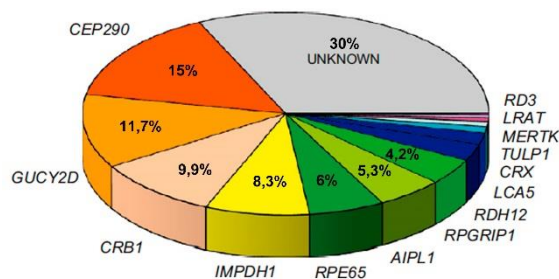


Esquema 7. Diagramas de sectores en los que se representan, en porcentajes, la prevalencia en la población de mutaciones en diferentes genes causantes de retinosis pigmentaria, dividido entre causas autosómicas recesivas (A), autosómicas dominantes (B) y ligadas al cromosoma X (C). Modificado de¹⁹⁶

pigmentario y en las células de la glía¹⁹⁵. Los primeros síntomas suelen aparecer durante la adolescencia, con dificultad en la visión nocturna y pérdida del campo visual periférico. Su prevalencia en la población es de 1/4000 personas y generalmente son de origen monogénico. Hasta el momento se han identificado 45 genes cuyas mutaciones causan esta enfermedad, aunque en el 30-50 % de los casos se desconoce la causa genética de la enfermedad¹⁹⁶ (Esquema 7).

5.2 Amaurosis congénita de Leber

La amaurosis congénita de Leber es un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas humanas en las que se produce una pérdida de la visión desde las primeras semanas de vida, además de nistagmo sensorial, pupilas amauróticas y ausencia de señal en el electrórretinograma. Su incidencia en la población es de 1/30 000 personas, y hasta la fecha se han identificado mutaciones en 20 genes que causan esta enfermedad, aunque en alrededor del 30 % de los casos la causa genética es aún desconocida¹⁹⁷ (Esquema 8).



Esquema 8. Diagrama de sectores en los que se representa, en porcentajes, la prevalencia en la población de mutaciones en diferentes genes causantes de amaurosis congénita de Leber. Modificado de¹⁹⁷

5.3 Degeneración macular asociada a la edad

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una enfermedad degenerativa de la retina en la que se produce una pérdida de la visión central durante la edad adulta. Tiene una prevalencia de alrededor del 2% en personas mayores de 40 años y del 25% en mayores de 80 años. Existen dos tipos diferentes de curso de la enfermedad: una llamada DMAE seca, que es la de mayor prevalencia, en la que se forman unos depósitos extracelulares heterogéneos en la membrana de Bruch que dañan a las células de epitelio pigmentario, y otra llamada DMAE húmeda, que afecta solo al 10% de los pacientes con esta patología, en la que se da un crecimiento de vasos sanguíneos desde la coroides que atraviesan la capa de epitelio pigmentario. En ambos tipos de DMAE acaba produciéndose la muerte de los fotorreceptores, en gran medida debido al daño producido en el epitelio pigmentario, pero mientras que la DMAE seca es de curso lento, la DMAE húmeda, que suele suceder a la seca, tiene un curso mucho más rápido. La causa de esta enfermedad es aún desconocida, aunque existen factores de riesgo como la edad, el consumo de tabaco o el tipo de dieta, que aumentan las probabilidades de padecerla¹⁹⁸.

Justificación, hipótesis y objetivos

La polaridad apicobasal se establece por la acción conjunta de tres complejos proteicos llamados: Scrib, que define la zona basal de la célula, Par y Crb, que definen la zona apical⁵⁶. El complejo Crb está compuesto por las proteínas PALS1, PATJ y alguna de las proteínas de la familia CRB: CRB1, CRB2 y CRB3. Estas isoformas presentan una expresión dependiente de tejido, de modo que, mientras que la expresión de CRB1 parece restringirse a la retina neural y el cerebro, CRB2 y CRB3 se expresan en numerosos tejidos epiteliales y sus derivados, incluida también la retina⁵⁶. Las tres isoformas son fundamentales para el correcto desarrollo de las funciones de estos tejidos, por lo que, por ejemplo, deficiencias en CRB3 están implicadas en la aparición de tumores epiteliales^{150, 151}, mutaciones en el gen CRB1 en humanos son causantes de dos tipos de degeneraciones congénitas de la retina llamadas retinosis pigmentaria y amaurosis congénita de Leber^{113, 137}, y la falta de CRB2 causa malformaciones durante el desarrollo embrionario y retinopatías en ratones^{138, 141}.

Hoy en día, se desconoce la causa de alrededor de un 30% de los casos de enfermedades degenerativas congénitas de la retina, así como algunas adquiridas como la degeneración macular asociada a la edad, pero que, en muchas ocasiones, se originan por una disfunción del epitelio pigmentario^{196, 197}.

El epitelio pigmentario es una monocapa de células epiteliales que se encuentra en íntimo contacto con los fotorreceptores, y que es imprescindible para el mantenimiento de la homeostasis de la retina. La mayoría de las funciones las lleva a cabo gracias a procesos determinados por la polarización apicobasal de las células epiteliales que lo componen. Hasta la fecha, diversos miembros de los tres complejos de polaridad han sido detectados en el epitelio pigmentario^{157, 176, 179, 180, 181, 184}, con excepción de las proteínas de la familia CRB, de las que solo se ha detectado la expresión del mRNA de CRB2¹³⁰, pero no la proteína. Ello podría deberse a las características de los anticuerpos utilizados, a los procedimientos seguidos para su inmunodetección o a ambos, por lo que, hasta la fecha, se desconoce si realiza alguna función en el epitelio pigmentario.

Justificación, hipótesis y objetivos

Con estos datos previos planteamos la siguiente hipótesis:

La proteína CRB2 se expresa en el epitelio pigmentario de la retina, siendo fundamental para el desarrollo de su polaridad apicobasal y, por lo tanto, del fenotipo epitelial; su defecto, en consecuencia, causa alteraciones en el funcionamiento normal del mismo.

Para comprobar esta hipótesis hemos fijado los siguientes objetivos:

- 1- Estudiar la expresión y localización de CRB2 en el epitelio pigmentario maduro.
- 2- Caracterizar la expresión y localización de CRB2 durante el proceso de polarización y diferenciación de las células de epitelio pigmentario.
- 3- Analizar el papel de CRB2 durante el proceso de polarización y diferenciación de las células de epitelio pigmentario.
- 4- Estudiar el papel de CRB2 en el epitelio pigmentario *in vivo*.

Materiales y Métodos

1. Animales de experimentación

En este trabajo se han utilizado ratones (*Mus musculus*) de la estirpe C57BL/6J, con edades comprendidas entre los 21 días postnatales los 3 meses de edad. El mantenimiento y manejo de los animales ha sido realizado conforme a las normativas europea, 2010/63/UE, y española, RD 53/2013, vigentes. La eutanasia de los animales se ha realizado mediante la administración de CO₂.

2. Cultivos celulares

2.1 Clonetics™ Human RPE (ChRPE) cells

En este trabajo hemos empleado células de epitelio pigmentario humano (Clonetics™ Human RPE cells, LONZA), a las que hemos denominado ChRPE, en su cuarto pase. Para su cultivo se sembraron alrededor de 50 000 células/cm² en cestas Transwell® con una membrana de polyester y un tamaño de poro de 4 µm (Costar®). Han sido mantenidas en medio de cultivo RtEBM™ - Retinal Pigment Epithelial Cell Basal Medium (LONZA) complementado con L-Glutamina (4 mM), bFGF (5 ng/ml), Gentamicina (30 µg/ml), Anfotericina (15 ng/ml) y 2 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS) durante los tres primeros días y sin FBS en adelante. El medio se ha cambiado cada tres o cuatro días hasta la finalización del cultivo.

2.2 Human embryonic kidney (HEK) 293 y HEK293FT

Se han empleado líneas celulares derivadas de células embrionarias de riñón humano HEK 293 (ATCC®), que han sido cultivadas en placas Petri Nunc™ (ThermoFisher Scientific) y mantenidas en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ThermoFisher Scientific) suplementado con 10 % de FBS inactivado por calor (Sigma-Aldrich™), 1 % MEM Non-Essential Amino Acids (ThermoFisher Scientific), 1 % penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich™), L-glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich™) y 1 % piruvato sódico (Sigma-Aldrich™), y que ha sido cambiado cada dos días. Las células HEK293FT (ATCC®) contienen una transfección estable del antígeno T del virus SV40

que mejorar la producción de partículas lentivirales en este tipo celular. Además, expresan un gen de resistencia a geneticina, por lo se han mantenido con 500 µg/ml del antibiótico G-418 (ThermoFisher Scientific) en el medio.

2.3 Neuro-2A (N2A)

Se ha empleado la línea celular derivada de neuroblastoma de ratón N2A (ATCC®) que ha sido cultivada en placas Petri Nunc™ (ThermoFisher Scientific) y mantenida en DMEM (ThermoFisher Scientific) suplementado con 10 % FBS inactivado por calor (Sigma-Aldrich™), 1 % MEM Non-Essential Amino Acids (ThermoFisher Scientific), 1 % penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich™) y 1 % piruvato sódico (Sigma-Aldrich™), y renovado cada dos días.

3. Generación y amplificación de plásmidos

Los plásmidos destinados a producir los shRNAs utilizados para esta tesis doctoral han sido generados mediante el inserto de las secuencias indicadas en la **Tabla 2**, en el vector pLVTHM (Addgene) (**Esquema 9**). A continuación se indica el protocolo común seguido para generar cada uno de ellos.

I. Anillamiento y fosforilación de los oligonucleótidos.

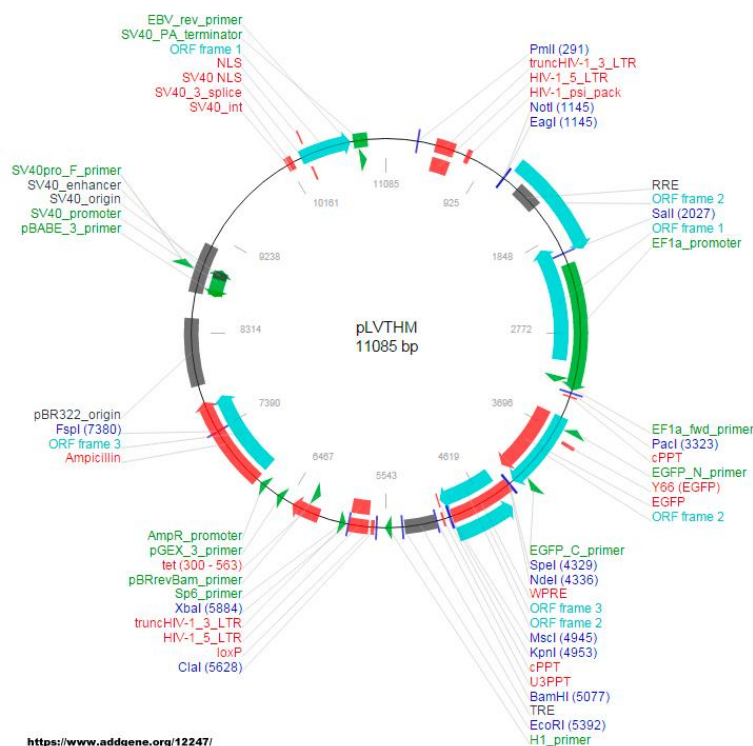
- Se añaden 5 µl de la pareja de oligonucleótidos (100 µM) a 40 µl de tampón de anillamiento (100 mM acetato potásico, 2 mM acetato magnésico y 30 mM HEPES pH 7,4) y se incuba 5 minutos (min) a 95 °C.
- Se cargan 10 µl de los oligonucleótidos anillados en un vial nuevo y se añaden 1,5 µl de la enzima polinucleótido kinasa (Promega™), 3 µl PNK buffer 10X (Promega™), 3 µl de ATP 10 mM (Promega™) y 12,5 µl de agua ultrapura.
- La mezcla se incuba durante 20 min a 37 °C, y posteriormente a 75 °C durante 10 min.

shRNA	Species	Sequence
shCONTROL	<i>E. gracilis</i>	5'-cgcgTGC GCGCTTTGTAGGATTCGttcaagagaCGAATCCTACAAAGCGCGCtttttgaaat-3'
shCRB2#1	<i>M. musculus</i>	5'-cgcgTGTGCCAGGCTACAGAAAGTtcaagagaACTTTCTGTAGCCTGGCACtttttgaaat-3'
shCRB2#2	<i>M. musculus</i>	5'-cgcgTGTACTTCTACTGCACCTGCTtcaagagaGCAGGTGCAGTAGAAGTCAtttttgaaat-3'
shCRB2#3	<i>M. musculus</i>	5'-cgcgTGAAGTGGATGAGGACGAAttcaagagaTTCGTCCTCATCCACTTCGtttttgaaat-3'
shCRB2#4	<i>M. musculus</i>	5'-cgcgTCCACCAGAGGAGAGACTTAttcaagagaTAAGTCTCTCCTCTGGTGGtttttgaaat-3'
shCRB2#1	<i>H. sapiens</i>	5'-cgcgTCGAATGACACCAAGGAAAttcaagagaTTTCCTTGGTGTGTCATTGCGtttttgaaat-3'
shCRB2#2	<i>H. sapiens</i>	5'-cgcgTGTGGATCTGTGGACTCATTtcaagagaAATGAGTCCACAGATCCACtttttgaaat-3'

Tabla 2. Lista de las secuencias de shRNA insertadas en el vector pLVTHM en la que se indica el nombre del shRNA (en negrita aquellos utilizados para el estudio tanto *in vivo* como *in vitro* de la función de CRB2), el origen específico de la secuencia contra la que va dirigido y su secuencia nucleotídica en sentido 5'-3', en la que se destaca, en mayúsculas, la secuencia complementaria al mRNA objetivo.

II. Corte y desfosforilación del plásmido.

- El corte del vector se lleva a cabo en una mezcla compuesta por un 10 % de DTT (dithiothreitol) 10 mM, 10 % espermidina 30 mM y 10 % de tampón (Tris acético 330 mM pH 7,5, acetato magnésico 100 mM, acetato potásico 660 mM y 1 mg/ml de suero de albumina bovino (BSA) (Sigma-Aldrich®)). El resto, hasta 100 µl, consiste en: 30 µg de DNA, 40 unidades (U) (no deben suponer más del 10 % del volumen de la mezcla) de las enzimas ClaI y MluI (ThermoFisher Scientific) y agua ultrapura hasta completar el volumen, y se incuba 12 horas (h) a 37 °C.
- Para la desfosforilación se añaden 1 U de la enzima fosfatasa FastAP (ThermoFisher Scientific) por cada µg de DNA, a los 100 µl de vector, 40 µl de FastAP buffer (ThermoFisher Scientific) y 230 µl de agua (la cantidad de enzimas no puede suponer más del 10 % del volumen de la mezcla). Se incuba a 37 °C durante 30 min y después a 80 °C durante 20 min para inactivar la enzima.



Esquema 9. Diseño esquemático de la secuencia del vector pLVTHM, en el que se han clonado las diferentes secuencias de shRNA, y en el que se indican diferentes regiones de interés del mismo, como lugares de lectura o algunos sitios de restricción.

III. Purificación de fragmentos.

El vector y los oligonucleótidos se someten a electroforesis en gel de agarosa (Pronadisa®) y los productos se purifican con GenElute™ Gel extraction Kit (Sigma-Aldrich®) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

IV. Ligación.

El vector pLVTHM (1 µl) y la pareja de oligonucleótidos (5 µl) han sido incubados durante 48 h a 15 °C con 5 U (1 µl) de la enzima ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs™) en 2 µl de tampón T4 buffer 10X (New England Biolabs™) y 11 µl de agua ultrapura, para producir la ligación de ambos fragmentos.

V. Amplificación

Para la obtención de mayores cantidades de todos los plásmidos se han utilizado bacterias *Escherichia coli* competentes de la cepa DH5α. Las bacterias se transformaron mediante choque térmico de 90 s a 42 °C y se cultivaron en medio sólido Luria Broth (LB)-agar (Para un litro: 10 g Bacto-Tryptona (Sigma-Aldrich™), 5 g Bacto-Yeast Extract (Pronadisa®), 10 g NaCl, 200 µl NaOH 10 M, 15 g agar y agua ultrapura hasta completar volumen) con ampicilina (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich™) a 37 °C durante 12 h. A continuación se incubaron colonias individuales durante 12 h en medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich™) a 37 °C y en agitación. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 15 000 g durante 10 min, las bacterias precipitadas se lisaron y se purificó el DNA en columnas de afinidad con los kits comerciales Wizard™ Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega™) y Genopure Plasmid Midi Kit (Roche Applied Science®), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

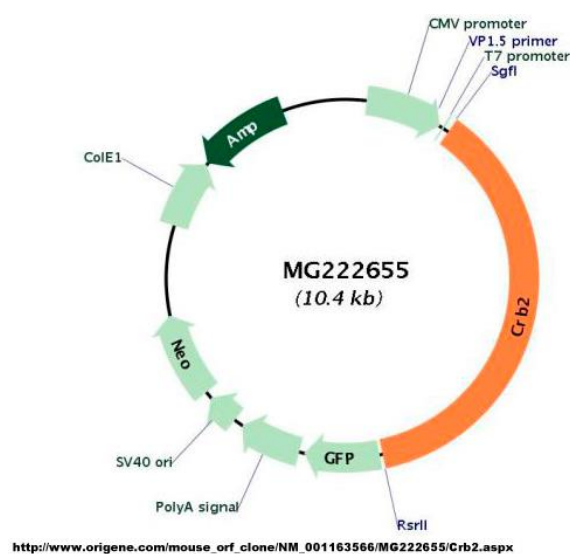
4. Transfección de cultivos celulares

4.1 Lipofectamina LTX

Los plásmidos generadores de shRNAs contra el mRNA *Crb2* de ratón han sido transfectados en células N2A con Lipofectamine® LTX y Plus™ Reagent (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los lisados celulares se recogieron 72 h después de la transfección para su análisis por Western blot como se explica en los apartados siguientes.

4.2 Fosfato cálcico

Método consistente en la formación de precipitados de fosfato cálcico junto con el DNA a transfectar, que son añadidos al medio y tomados por las células en cultivo. Para ello se han mezclado 2-4 µg de DNA con 100 µl de CaCl 1 M y 200 µl de agua ultrapura. Esta solución se ha mezclado lentamente por goteo con 300 µl de HEPES buffered saline 2X (Sigma-Aldrich™) en agitación. La mezcla se ha incubado a temperatura ambiente durante 20 min y se ha añadido por goteo a la placa de cultivo. Siguiendo este método se han transfectado los plásmidos generadores de shRNAs contra el mRNA *CRB2* de humano en el vector pLVTHM, y el plásmido *Crb2* ORF Clone en el vector pCMV6-AC-GFP (OriGene Technologies) que codifica para la proteína *CRB2* humana fusionada por su extremo C-terminal a tGFP (**Esquema 10**), en células HEK293; y los plásmidos necesarios para generar partículas lentivirales psPAX2 (Addgene) y pMD2.G (Addgene) junto con los correspondientes plásmidos generadores de shRNAs, en células HEK293-FT.



Esquema 10. Diseño esquemático de la secuencia del vector MG222655, que codifica para la proteína *CRB2*-GFP, y donde se indican diferentes regiones de interés del mismo.

5. Generación de partículas lentivirales e infección de células ChRPE

Para la generación de partículas lentivirales se utilizó la técnica del fosfato cálcico para transfectar alrededor de 2,5 millones de células HEK293-FT con una mezcla de: 20 µg del plásmido pLVTHM con el shRNA de interés, 15 µg del plásmido psPAX2 (Addgene) que codifica para las proteínas de empaquetamiento del DNA lentiviral y 6 µg del plásmido pMD2G (Addgene) que codifica para las proteínas de la envuelta del virión. El medio de cultivo se renovó a las 8 h de la transfección y 48 h más tarde se recolectó el medio, en el que se encuentran las partículas lentivirales, y se eliminaron los posibles restos celulares por centrifugación a 1000 g durante 5 min a temperatura ambiente. Las partículas lentivirales

destinadas a las inyecciones subretinales se concentraron mediante ultracentrifugación a 121 500 g durante 2 h a 4 °C y se disolvieron en PBS. En ambos casos las partículas lentivirales se han conservado a -80 °C.

Para la infección de células ChRPE se añadió 20 µl del medio con las partículas lentivirales por cada 16 500 células en cultivo, el mismo día de la siembra, y fue retirado a los tres días junto con el primer cambio de medio del cultivo.

6. Medición de resistencia eléctrica transepitelial (TER)

La resistencia eléctrica transepitelial o TER (Trans-Epithelial Electrical Resistance) de sus siglas en inglés, expresada en $\Omega \cdot \text{cm}^2$, ha sido medida con un voltímetro EVOM2 (World Precision Instruments) mediante unos electrodos STX2 (World Precision Instruments), que han sido sumergidos en cada una de las cámaras de los cestas Transwell®, calculada sustrayendo el valor de un blanco y normalizada respecto al área del filtro de cultivo.

7. Producción de anticuerpos

Para la generación de anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína murina CRB2 (UniProtKB - Q80YA8) se ha utilizado la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para seleccionar una secuencia antigénica única de esta proteína utilizando la herramienta Antigenicity Plot de la página *web* www.bioinformatics.org. La secuencia correspondiente a los aminoácidos 1243 a 1256 con una cisteína en su extremo terminal N-terminal ha sido enviada a la empresa GenScript Corporation™, que se ha encargado de la generación del péptido y del antisuero purificado de conejo.

8. Reverse transcription (RT)-PCR

Tras el sacrificio del animal, se han extraído los ojos con un par de pinzas y se han lavado con tampón fosfato 0,1 M pH 7,4. En este tampón se ha retirado la córnea y el cristalino con pinzas y tijeras oftalmológicas, y se han extraído la retina y las células de epitelio pigmentario por separado.

I. Extracción de RNA

A continuación se ha extraído el RNA total de estos tejidos mediante el siguiente procedimiento:

- En primer lugar se lisa el tejido en 1000 µl de TRIzol® LS Reagent (ThermoFisher Scientific) y se centrifuga a 12 000 g durante 10 min a 4 °C.
- A continuación se recolecta el sobrenadante y se incuba a temperatura ambiente durante 5 min.
- Se añaden 200 µl de cloroformo, se mezcla por agitación y se incuba durante 3 min a temperatura ambiente.
- Posteriormente se centrifuga a 12 000 g durante 15 min a 4 °C.
- De las tres fases formadas se aísla la superior, que contiene el RNA, y se le añaden 500 µl de isopropanol.
- Se mezcla por agitación, se incuba a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifuga a 12 000 g durante 15 min a 4 °C.
- A continuación se decanta el líquido y se añaden 1000 µl de etanol al 75 %.
- Se mezcla por agitación y se centrifuga a 7500 g durante 5 min a 4 °C.
- Posteriormente se decanta el líquido y se deja secar el contenido del vial con la tapa abierta durante 10 min.
- Por último se disuelve el RNA en 100 – 250 µl de agua ultrapura.

II. Purificación de RNA

Para eliminar posibles trazas de DNA en la muestra, se ha tratado con TURBO DNA-free™ kit (ThermoFisher Scientific). Para ello se ha seguido el siguiente protocolo:

- Se añade 0,1 volumen de 10X TURBO DNase Buffer y 1 µL de TURBO DNase al RNA y se mezcla por pipeteo.
- A continuación se incuba durante 30 min a 37 °C.
- Posteriormente se añade a la mezcla 0,1 volumen de DNase Inactivation Reagent, se mezcla por pipeteo y se incuba 5 min a temperatura ambiente.
- Finalmente se centrifuga a 10 000 g durante 90 s para precipitar el DNase Inactivation Reagent, y se transfiere el RNA presente en el sobrenadante a un vial nuevo.

Materiales y Métodos

La cantidad del RNA presente en la solución ha sido cuantificada con la medición, con un nanofotómetro (IMPLEN), de la absorbancia (A) de la muestra a 260 nm, y su pureza con la medición de la relación entre la A260 y A280 nm.

III. Retrotranscripción

A continuación se hizo una retrotranscripción a cDNA con RETROscript® kit (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones de la casa comercial que consisten en:

- Se mezclan 2 µg de RNA total con 2 µl de decámeros aleatorios que actuarán como cebadores en la retrotranscripción y agua ultrapura para completar hasta 12 µl.
- Se calienta la mezcla a 85 °C durante 3 min y se ponen en hielo.
- A continuación se añaden el resto de componentes que llevan a cabo la reacción que son: 2 µl de RT10X buffer, 4 µl de mezcla de dNTP (Deoxynucleoside triphosphate), 1 µl de inhibidor de RNasa y 1 µl de la transcriptasa reversa MMLV-RT.
- Se mezclan bien y se incuba durante 1 h a 44 °C.
- Finalmente se incuba a 92 °C durante 10 min para inactivar la transcriptasa reversa y se almacena a -20 °C hasta el siguiente paso.

IV. Amplificación por PCR.

Por último se llevó a cabo la amplificación por PCR de las secuencias específicas del cDNA de *Crb1*, *Crb2*, *Crb3* y *Actina* en muestras de retina y epitelio pigmentario. Para ello empleamos 300 ng de cDNA y entre 0,2 µM a 0,5 µM de los *primers* indicados en la [Tabla 3](#), en 20 µl de solución bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de la doble hélice de DNA durante 3 min a 94 °C seguido de un periodo de amplificación de 35 ciclos de 45 segundos (s) a 94 °C, 30 s de anillamiento a 49 °C en el caso de *Crb1* y 56 °C para *Crb2*, *Crb3* y *Actina*, 30 s a 72 °C y un periodo de extensión final de 10 min a 72 °C.

Gen	Exones	Sentido (5'-3')	Antitendido (5'-3')
<i>Crb1</i>	6	ACAAGTGGCTCCATACAGG	ACGAAATGCCATTCTCCATC
<i>Crb2</i>	2-4	GCAGATCACTACGAGTGCC	CCGGAAACCGTTGACCAG
<i>Crb3</i>	2-4	TAACAGCACCGGACCC	ACTCCCAGAATGGAAAAGAC
<i>β-actina</i>	4	AGCCATGTACGTAGCCATCC	ACCCTCATAGATGGGCACAG

Tabla 3. Tabla en la que se muestran las secuencias nucleotídicas de los *primers* utilizados para el análisis mediante RT-PCR de la expresión de los mRNA indicados, así como el exón o exones donde se produce la amplificación.

Asimismo, se han llevado a cabo controles negativos *minus-RT*, en el que el cDNA sin los componentes de la reacción se sometió a los ciclos de amplificación, y *minus-template* PCR, en el

que se ha sustituido el cDNA por agua ultrapura, para descartar cualquier contaminación de la muestra de cDNA o de los reactivos de la PCR respectivamente.

V. Visualización del resultado.

Para analizar el resultado de la RT-PCR, 20 µl de cada producto de la reacción se cargaron en un gel de agarosa (Pronadisa®) del 2 % (p/v) disuelta en tampón Tris-borato-EDTA, con 0,4 µg/ml de bromuro de etidio, fueron sometidos a electroforesis y visualizados en una lámpara de luz ultravioleta Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories).

9. Western blot

I. Preparación de las muestras

Todas las muestras para Western blot han sido recogidas en tampón de lisis RIPA (150 mM cloruro sódico, 1 % Triton X-100 (v/v), 0,5 % deoxicolato sódico (p/v), 0,1 % dodecil sulfato sódico (SDS) (p/v), 50 mM Tris, pH 8) con inhibidores de proteasas (1:1000 (v/v), Sigma-Aldrich™). Los tejidos han sido disgregados mecánicamente, incubados 2 h a 4 °C en agitación y centrifugados a 12 000 g durante 20 min a 4 °C para obtener el sobrenadante y desechar el precipitado. La concentración de proteínas ha sido cuantificada mediante el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories) en un espectrofotómetro LT 4000 microplate reader (Labtech). A continuación se ha añadido tampón de carga Laemmli pH 6,8 a una concentración final de 2 % SDS (v/v), 5 % 2-mercaptoetanol (v/v), 10 % glicerol (v/v), 0,002 % bromophenol blue (p/v), 62,5 mM Tris HCl.

II. Electroforesis

La electroforesis ha sido llevada a cabo en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (AMRESCO®). Para ello, las proteínas han sido calentadas a 70 °C durante 10 min para producir su desnaturalización, y mantenidas en hielo hasta ser cargadas en el gel. A continuación han sido sometidas a electroforesis, junto con un marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad Laboratories), aplicándole un voltaje constante de entre 90 y 150 V en un tampón de migración (25 mM de TRIS base, 190 mM de glicina y SDS al 0,1 %, pH 8,3 en agua) en una cubeta mini-PROTEAN® (Bio-Rad Laboratories), hasta que las proteínas de menor peso molecular del marcador han llegado al extremo del gel.

III. Transferencia

Posteriormente han sido transferidas a una membrana de PVDF Immobilon™ (Millipore®) activada con metanol, mediante la aplicación de un amperaje constante de 300 mA durante 3 h a 4 °C en un tampón de transferencia (25 mM de TRIS base, 190 mM de glicina y 20 % metanol (v/v), pH 8,3 en agua) en un sistema Mini Trans-Blot (Bio Rad®).

IV. Preincubación

La membrana con las proteínas se incubó en un tampón Tris Base Salino Tween-0,01 % (v/v) (TBST) con BSA 2 % (p/v) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación.

V. Incubación con el anticuerpo primario

A continuación se ha incubado la membrana con los anticuerpos primarios correspondientes, en tampón TBST-BSA 2 % durante una noche a 4 °C a la concentración indicada en la **Tabla 4**.

En el caso del ensayo de competitividad, se ha utilizado el anticuerpo primario incubado previamente durante 1 h a temperatura ambiente con 0,2 mg/ml del péptido usado para producir el anticuerpo. De este modo se produce la saturación e inactivación de los anticuerpos capaces de reconocer el antígeno incubado. Por lo tanto, el marcaje resultante de la utilización de esta solución será inespecífico, debido a aquellos anticuerpos presentes que no son capaces de reconocer el antígeno.

Anticuerpos y moléculas fluorescentes	Casa comercial	Referencia	WB	IF
aPKC	Santa Cruz Biotechnologies	sc-216		1/100
Basson	Enzo Biochem	SAP7F407		1/5000
CRB2	Casero		5 µg/ml	5 µg/ml
CRB2	ThermoFisher scientific	PA5-25628		1/100
DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)	Sigma Aldrich	D9542		1/10 000
Faloidina-FITC	Sigma Aldrich	P5282		1/500
GAPDH	Sigma Aldrich	G8795	1/10 000	
GFAP	Sigma Aldrich	G6171	1/1000	1/1000
GFP	Clontech	632381	1/1000	
GST	Cedido por Dr. Juan Carlos Arévalo		0,5 µg/ml	
Iba1	Wako Pure Chemical Industries	019-19741		1/750
Ki67	Abcam	ab15580		1/250
Ocludina	ThermoFisher scientific	71-1500	1/200	1/500
p120	BD Biosciences	610134		1/100
PALS1	Abnova	H00064398-A01		1/250
PALS1	Millipore	07-708	1/1000	
PAR3	Millipore	07-330	1/500	1/250
PATJ	Abcam	ab102113		1/200
PNA-FITC	Sigma Aldrich	L7381		1/500
RPE65	Abcam	ab13826	1/5000	1/1000
Sinapsina	Synaptic systems	106001	1/1000	
Sinaptotagmina	BD	610433	1/1000	
TO-PRO® 3-Iodide	ThermoFisher scientific	T3605		1/1000
ZO-1	ThermoFisher scientific	33-9100		1/100
β-actina	Sigma Aldrich	A5441	1/5000	
β-catenina	BD Biosciences	610154		1/250
β-catenina	Santa Cruz Biotechnologies	sc-1496	1/100	

Tabla 4. Tabla en la que se indica el nombre de los anticuerpos y moléculas fluorescentes utilizados, la casa comercial donde se han adquirido, su referencia de venta, así como la concentración (v/v) a la que se ha utilizado en su respectiva técnica. WB: Western blot; IF: inmunofluorescencia

VI. Lavados e incubación con el anticuerpo secundario

Posteriormente se han realizado tres lavados de 10 min cada uno, a temperatura ambiente con TBST, y se ha incubado la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch™), a una concentración de 1:5000 (v/v) en TBST-BSA 2 % y leche desnatada en polvo 5 % (p/v) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación se han realizado tres lavados a temperatura ambiente con TBST de 10 min cada uno y se ha procedido al revelado.

VII. Revelado

Para el revelado las membranas incubadas con anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina, se han lavado durante 15 min a temperatura ambiente en tampón Tris-HCl 1 M, MgCl₂ 1 M, NaCl 4 M y 20 % de Triton-X100 a pH 9,5, y a continuación se han incubado con el medio de revelado, formado por el tampón anterior y los sustratos de la enzima: 50 µl de azul de nitrotetrazolio (NBT, Roche Applied Science®) y 37,5 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP, Roche Applied Science®) por cada 10 ml del tampón. La enzima lleva a cabo una reacción de oxidoreducción sobre la membrana que genera un precipitado de color azul, y que es detenida con TBST. Para el revelado de membranas incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, se ha utilizado el kit de quimioluminiscencia Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad Laboratories). Este, junto con la peroxidasa, produce una señal quimioluminiscente que ha sido expuesta a una película fotográfica Super RX (Fujifilm). La señal se ha revelado con el kit RP X-OMAT (Kodak).

VIII. Tratamiento y cuantificación de imágenes

Las películas fotográficas fueron digitalizadas y se han realizado pequeños ajustes en el brillo y el contraste con el programa informático Adobe® Photoshop® CS5 EXTENDED. La cuantificación de la expresión de CRB2 por Western blot tras la transfección de los diferentes shRNAs en células HEK293 ha sido realizada mediante la medición, en unidades arbitrarias, de la intensidad de las bandas correspondientes, normalizadas respecto a su carga, con el programa informático ImageJ.

10. Inyecciones subretinales

La operación ha sido llevada a cabo en ambos ojos de animales de 21 días de edad anestesiados mediante inhalación de isoflurano (Forane®). Inicialmente el animal ha sido introducido en una cámara de inducción de la anestesia con atmósfera de isoflurano y una vez sedado se ha colocado bajo una lupa con una máscara de gas para proporcionar directamente el anestésico en las vías respiratorias. Entonces se le han aplicado en el ojo los siguientes colirios en solución: ®Colircusí Tropicamida (Alcon Cusí, S.A.), con efecto midriático de instauración rápida y de corta duración, que permite un mejor acceso a la retina sin dañar el iris, ®Colircusí Anestésico 0,50 % (Alcon Cusí, S.A.), que proporciona anestesia local rápida y Viscofresh® (Allergan Pharmaceuticals Ireland), un lubricante que mantiene la córnea hidratada durante la operación y además facilita la inyección.

Una vez comprobada la pérdida del reflejo podal y de la cola, se ha procedido a realizar la inyección. Para ello se ha utilizado un sistema de microinyección UltraMicroPump III (World Precision Instruments, Inc) controlado por un microprocesador Micro4™ (World Precision Instruments, Inc) que permite la liberación controlada de la sustancia de interés. Al sistema se le ha acoplado una jeringa NanoFil 100 µL (World Precision Instruments, Inc) con un tubo flexible Silflex-2 (World Precision Instruments, Inc) unido a una aguja de inyección de 33 G (33 Gauge Blunt Needle, World Precision Instruments, Inc). Se ha realizado una pequeña incisión en la córnea con una aguja de 30 G (Henke Sass Wolf) a través de la cual se ha introducido la aguja de inyección hasta llegar al epitelio pigmentario, evitando el cristalino y atravesando la retina neural, liberando entonces en el espacio subretinal 1 µl de la solución con las partículas lentivirales a una velocidad de 150 nl/s. Entonces se han retirado la aguja de inyección y la máscara de gas, y se han limpiado los colirios y los posibles restos de sangre de la superficie del ojo con una gasa. Se ha aplicado de nuevo una gota de ®Colircusí Anestésico 0,50 % (Alcon Cusí, S.A.) y se ha situado al animal en una manta térmica hasta su recuperación. Una vez ha despertado se ha devuelto a su jaula dándose por finalizado el procedimiento.

11. Inmunofluorescencia

Esta técnica ha sido realizada en cultivos celulares, en *Flat mounts* de epitelio pigmentario y en criosecciones de globos oculares inyectados con partículas lentivirales. La obtención y preparación del material previa a la técnica de inmunofluorescencia ha consistido en:

11.1 Preparación de criosecciones

Los animales inyectados han sido sacrificados a los 60 días posinyección (DPI), se han extraído los ojos con un par de pinzas y se les ha realizado un pequeño corte en la córnea con una cuchilla para facilitar la entrada del fijador. Los globos oculares son fijados durante 2 h con paraformaldehído (PFA) 4 % (p/v) en tampón fosfato 0,1 M pH 6,9, a 4 °C en agitación, y a continuación se han lavado con tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 1 h. Posteriormente, la córnea y el cristalino se retiran con tijeras oftalmológicas y pinzas bajo una lupa. A continuación, los globos oculares se crioprotegen con baños de 12 h cada uno a 4 °C y en agitación, en soluciones de concentración creciente del 10, 20 y 30 % de sacarosa (p/v) en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, se incluyen en Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura), se congelan con nitrógeno líquido y se almacenan a -20 °C. Por último, se han realizado secciones de 14 µm de grosor con un criostato (Microm HM560, Thermo Scientific), que han sido recogidas en portaobjetos Superfrost Ultra Plus® (ThermoFisher Scientific), y han sido conservadas a -20 °C hasta su utilización. Mediante microscopía de fluorescencia se han seleccionado aquellas secciones adyacentes a las que contienen la zona de inyección para su posterior análisis.

11.2 Preparación de *Flat mounts* de epitelio pigmentario

Se han obtenido *Flat mounts* de epitelio pigmentario de animales adultos de 90 días de edad y de animales inyectados de 60 DPI. Para ello, una vez sacrificados, los globos oculares se extraen con un par de pinzas y se les realiza un pequeño corte en la córnea con una cuchilla. A partir de este punto se han seguido dos protocolos diferentes según el estudio para el que han sido destinados. En el caso de las muestras de animales sometidos a la inyección, y destinadas para el análisis de las células microgliales presentes en el espacio subretinal, primero se han fijado durante 2 h con PFA 4 %, a 4 °C en agitación, y se han lavado con tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 durante, al menos 1 h. A continuación se ha retirado la retina neural con pinzas y tijeras oftalmológicas, y se ha reservado la zona posterior del ojo, donde se encuentra el epitelio pigmentario, en tampón fosfato 0,1 M pH 6,9 hasta su procesamiento posterior. Para el resto de los estudios inmunohistológicos; en primer lugar se ha retirado la retina neural y posteriormente se ha fijado la zona posterior del ojo con PFA 4 % durante 10 min a 4 °C en agitación y se ha lavado con tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 durante, al menos, 30 min.

El procedimiento de marcaje con los anticuerpos ha sido similar para todas las muestras, con alguna excepción que indicaremos a continuación.

Una vez finalizada la técnica inmunohistológica en los *Flat mounts* y previamente al montaje que se explica a continuación, se realizaron cuatro cortes perpendiculares dos a dos en el tejido y se colocaron en un portaobjetos con el epitelio pigmentario en contacto con el cubreobjetos.

11.3 Preparación de cultivos celulares

Para la fijación de las células ChrPE a los 7, 14 y 21 días de cultivo, se ha retirado el medio de cultivo y se ha añadido PFA 4 % a 4 °C durante 10 min.

I. Lavados y permeabilización

Para todos los casos, en primer lugar se ha realizado un lavado con tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 de 10 min a temperatura ambiente, seguido de dos lavados con PBS con el detergente Triton™ X100 (Sigma-Aldrich®) (PBS-Tx) a una concentración del 0,02 % (v/v) para el caso de las criosecciones y del 0,2 % para los cultivos celulares y los *Flat mounts*. Esta concentración del detergente se mantiene constante para cada caso durante todos los pasos en los que se requiere permeabilizar.

II. Bloqueo

A continuación se ha incubado el material con una solución de PBS-Tx, BSA al 1 % (p/v) y suero al 5 % (v/v) del animal en el cual está hecho el anticuerpo secundario a utilizar, durante 1 h a temperatura ambiente.

III. Incubación con el anticuerpo primario

Después del bloqueo se ha incubado el material con una solución con PBS-Tx, BSA 1 %, suero al 2 % del animal en el cual está hecho el anticuerpo secundario a utilizar, y el anticuerpo primario a la concentración que indica la **Tabla 4**, durante una noche a 4 °C.

En el caso del ensayo de competitividad se ha utilizado el anticuerpo primario incubado previamente durante 1h a temperatura ambiente con 0,2 mg/ml del péptido usado para producir el anticuerpo.

IV. Lavados

A continuación se han realizado tres lavados de 10 min cada uno con PBS-Tx.

V. Incubación con el anticuerpo secundario y marcadores nucleares.

Posteriormente, si procede, se ha incubado el material con una solución con PBS-Tx, BSA 1 %, suero al 2 % del animal en el cual está hecho el anticuerpo secundario, el marcador nuclear DAPI o TO-PRO® 3-Iodide, y anticuerpos secundarios AlexaFluor® 488 o AlexaFluor® 555 (ThermoFisher Scientific) dirigidos contra la fracción constante del anticuerpo primario, a una concentración de 1:750 (v/v), durante 1 h a temperatura ambiente.

VI. Lavados y montaje

Por último se han realizado dos lavados con PBS-Tx y otro con PBS de 10 min a temperatura ambiente y se ha procedido al montaje de las muestras en un portaobjetos, con el medio Prolong® Gold antifading reagent (ThermoFisher Scientific) y con cubreobjetos.

12. Microscopía electrónica

Mediante microscopía electrónica de transmisión se ha analizado la ultraestructura de las células ChrPE en cada una de las condiciones estudiadas. Para ello hemos seguido el siguiente procedimiento:

I. Fijación

Las muestras han sido fijadas en una solución con PFA 2 % y glutaraldehído 2 % (v/v) en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4 durante 24 h a 4 °C.

II. Posfijación

Posteriormente las muestras se han incubado en una solución con OsO₄ 1% (v/v) y K₃Fe(CN)₆ 1 % (v/v) en agua ultrapura durante 2 h a 4 °C, en agitación y oscuridad. A continuación se han lavado abundantemente con agua.

III. Deshidratación

Para deshidratar las muestras, estas se han sumergido en un gradiente creciente de etanol, desde el 50 % al 100 %, durante 10 min cada uno y en agitación. Posteriormente se han realizado tres baños en óxido de propileno de 10 min cada uno y en agitación.

IV. Inclusión

A continuación se han incluido las muestras en resina Epoxy EMBED-812 (Electron Microscopy Sciences). Para ello el tejido se sumerge a temperatura ambiente y en agitación en una mezcla de óxido de propileno/resina (3/1) durante 1 h, después durante una noche

en óxido de propileno/resina (1/1), en óxido de propileno/resina (1/3) 1 h y finalmente en resina pura durante 1 h. Por último las muestras se han colocado en los moldes adecuados con la resina pura que polimeriza y endurece en una estufa a 60 °C durante 12 h.

V. Seccionamiento

Se ha empleado un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert/Leica) para realizar secciones semifinas de 0,5 µm que se depositan en portaobjetos Superfrost Ultra Plus® (ThermoFisher Scientific) y se tiñen con azul de Toluidina (0,5 % de tetraborato sódico (v/v) en agua destilada) y secciones ultrafinas de 50-70 nm de grosor que se recogieron en rejillas de cobre (Electron Microscopy Science).

VI. Contrastado

Las secciones ultrafinas son posteriormente contrastadas con una solución de acetato de uranilo al 2 % (v/v) en etanol al 50 %, durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Se han lavado varias veces con agua ultrapura, y a continuación se han incubado con citrato de plomo durante 10 min a temperatura ambiente y en una atmósfera sin CO₂ para evitar la precipitación del plomo. Por último se han lavado varias veces con agua ultrapura y se han secado para su visualización.

13. Obtención y análisis de imágenes

13.1 Fotografías de fluorescencia

Las imágenes de células de epitelio pigmentario en *Flat mount*, en cultivo y las crio secciones de retina, se obtuvieron en un microscopio láser confocal (Leica TCS SP2) con un pinhole de 1,2 Airy Units y objetivos de aceite de inmersión 40 x y 63 x. Los láseres de 488 nm, 543 nm y 633 nm han sido utilizados para excitar los fluorocromos AlexaFluor® 488, AlexaFluor® 555, AlexaFluor® 633 y TO-PRO® 3-Iodide, y los diferentes canales han sido capturados de forma secuencial. Las imágenes obtenidas han sido procesadas y se han realizado pequeños ajustes en el brillo y el contraste con los programas informáticos Adobe® Photoshop® CS5 EXTENDED y Leica Confocal Software. Para la reconstrucción en 3 dimensiones se han utilizado 35 secciones ópticas con una distancia de 284,9 nm entre cada una de ellas y 8,8 µm en total. Este conjunto de imágenes se importaron al programa informático ImageJ donde se utilizaron las herramientas LOCI Bio-formats y 3D viewer y se ha creado un video de la reconstrucción tridimensional de todas las secciones.

Para la toma de imágenes panorámicas de *Flat mounts* de animales inyectados, así como para los estudios de proliferación y densidad de los cultivos celulares se ha utilizado un microscopio de Axio Observer Z1 (Zeiss). Las imágenes obtenidas han sido procesadas y se han realizado pequeños ajustes en el brillo y el contraste con el programa informático Adobe® Photoshop® CS5 EXTENDED y ZEN 2011. El recuento del número de células totales y positivas para la proteína Ki67 en los cultivos celulares ha sido realizado con la herramienta Image-based Tool for Counting Nuclei (ITCN) del programa informático ImageJ. El recuento de las células de microglía en los *Flat mounts* de animales inyectados ha sido realizado con la herramienta Cell Counter del programa informático ImageJ.

13.2 Microrgafías de microscopía electrónica

Las imágenes han sido obtenidas en un microscopio JEOL JEM-1011 HR con la cámara CCD Gatan ES1000W con el software iTEM y procesadas con el programa informático Adobe® Photoshop® CS5 EXTENDED. Las mediciones de la altura de las células y la posición relativa del núcleo han sido realizadas con el programa informático ImageJ.

14. Análisis estadísticos

Los distintos análisis estadísticos han sido realizados mediante el programa informático IBM® SPSS® Statistics 20.0. En primer lugar se ha comprobado si los datos siguen una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov para muestras de $n > 50$ y la de Shapiro-Wilk para muestras de $n < 50$. A continuación, para las muestras con una distribución paramétrica se ha comprobado la igualdad de varianzas mediante la prueba de Levene. Para determinar si existen diferencias en muestras con una distribución paramétrica y varianzas iguales se ha realizado la prueba T de Student, para comparaciones entre dos grupos, o el test ANOVA en el caso de comparaciones entre más de dos grupos y, en el caso de rechazar la hipótesis nula, la prueba de Bonferroni para realizar comparaciones múltiples. En el caso de las muestras con una distribución no paramétrica o con varianzas distintas se ha determinado si existen diferencias entre las muestras mediante la prueba de U de Mann-Whitney para comparar dos muestras independientes, o la de Kruskal-Wallis para más de dos muestras independientes. Se han considerado que existen diferencias significativas (*) si $p < 0,05$ y altamente significativas (**) si $p < 0,01$.

Resultados

1. CRB2 se localiza en las uniones ocluyentes del epitelio pigmentario

En este punto abordamos el primer objetivo de la presente tesis doctoral: estudiar la expresión y localización de CRB2 en el epitelio pigmentario maduro, para lo que hemos utilizado como modelo de estudio el epitelio pigmentario de ratones adultos.

1.1 Análisis de la expresión de los mRNA de las isoformas CRB en el epitelio pigmentario

En primer lugar analizamos la expresión de los mRNA de las tres isoformas CRB (*Crb1*, *Crb2* y *Crb3*) mediante RT-PCR, en extracto total de RNA de retina neural y de epitelio pigmentario de forma independiente. De este modo observamos que los tres transcritos se expresan en la retina neural, como ya se había descrito, pero comprobamos que en el epitelio pigmentario solo se expresan *Crb2* y *Crb3* (**Figura 1**). Por lo tanto, este resultado abre la posibilidad de que las proteínas CRB2 y CRB3 se expresen en el epitelio pigmentario, y descarta la expresión de CRB1 en este tipo celular.

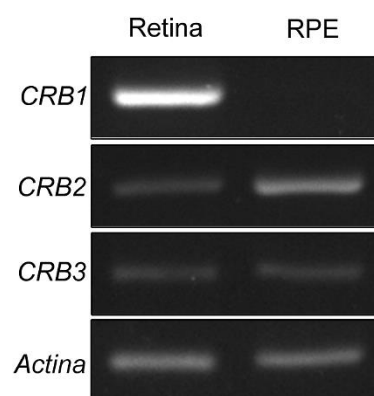


Figura 1- Estudio de la expresión de los mRNA *Crb1*, *Crb2* y *Crb3* en la retina neural y el epitelio pigmentario. El análisis mediante RT-PCR indica que, mientras que el mRNA *Crb1* solo se expresa en la retina neural, los mRNA *Crb2* y *Crb3* se encuentran expresados tanto en la retina neural como en el epitelio pigmentario. Los niveles de amplificación del mRNA de *Actina* son similares en ambos tejidos.

1.2 Caracterización del anticuerpo dirigido contra CRB2

Puesto que los anticuerpos comerciales disponibles hasta la fecha no proveen resultados satisfactorios en cuanto a la inmunodetección de CRB2 en el epitelio pigmentario, hemos diseñado un nuevo anticuerpo dirigido contra esta proteína mediante el procedimiento descrito en el apartado de “**Materiales y Métodos**”, con el fin de detectar su expresión en este tejido. Para caracterizar el nuevo anticuerpo generado, en primer lugar sobreexpresamos CRB2 fusionada a GFP en la línea celular HEK293, donde detectamos mediante Western blot la proteína exógena a unos 180 kDa con anticuerpos

Resultados

dirigidos contra GFP y CRB2 (**Figura 2A**). El anticuerpo dirigido contra CRB2 detecta además, una segunda banda de alrededor de 150 kDa en las células sin transfectar y con la sobreexpresión (**Figura 2A**), que podría corresponder a la proteína endógena, ya que está muy cerca de su peso molecular estimado, que es de 137 kDa¹⁹⁹. Para investigar la posibilidad de que la banda detectada a 150 kDa corresponda, efectivamente, a la proteína CRB2, transfectamos en células de origen murino N2A, donde también se detecta una banda a 150 kDa con este mismo anticuerpo (**Figura 2B**), cuatro shRNAs diferentes dirigidos contra *Crb2* (shCRB2 #1-#4) y un shRNA control (shCTR) que no reconoce ninguna secuencia de mRNA presente en las células de mamíferos. De este modo observamos que tres de los cuatro shCRB2 (shCRB2 #2-4) producen una disminución en la expresión de la proteína de 150 kDa al compararlo con el efecto del shCTR (**Figura 2B**), confirmando que esta banda corresponde a la proteína CRB2 endógena.

A continuación, debido a la gran similitud que existe entre el dominio citoplasmático de las proteínas CRB, quisimos descartar cualquier reacción cruzada entre el anticuerpo dirigido contra CRB2 y la proteína CRB3, que podría también expresarse en el epitelio pigmentario. Para ello, realizamos una electroforesis de la proteína CRB3 fusionada a GST purificada (Abnova), observando que esta proteína es detectada por un anticuerpo contra GST en un peso aproximado de 40 kDa, pero no así con el anticuerpo contra CRB2 (**Figura 2C**), lo que descarta así la reacción cruzada.

Por lo tanto, el anticuerpo contra CRB2 es capaz de reconocer específicamente CRB2, que tiene un peso molecular de alrededor de 150 kDa.

1.3 Detección de CRB2 en el epitelio pigmentario

Una vez comprobada la efectividad y especificidad del anticuerpo, investigamos la expresión de CRB2 en el epitelio pigmentario del ratón. Para ello realizamos un Western blot con proteínas totales de cerebro y retina neural, que utilizamos como controles positivos de su expresión, ya que su presencia en estos tejidos ha sido demostrada previamente^{155, 184}, músculo como control negativo, ya que no expresa su mRNA¹³⁰, y epitelio pigmentario (**Figura 2D**). De esta manera, con el anticuerpo para CRB2 detectamos una banda de alrededor de 150 kDa (**Flecha en Figura 2D**), que coincide con el peso molecular detectado en las líneas celulares, y otra a alrededor de 260 kDa (**Cabeza de flecha en Figura 2D**) en cerebro, retina neural y epitelio pigmentario, pero no así en músculo. La presencia de la proteína de sinapsis, Sinapsina, solo en la muestra de cerebro y retina neural,

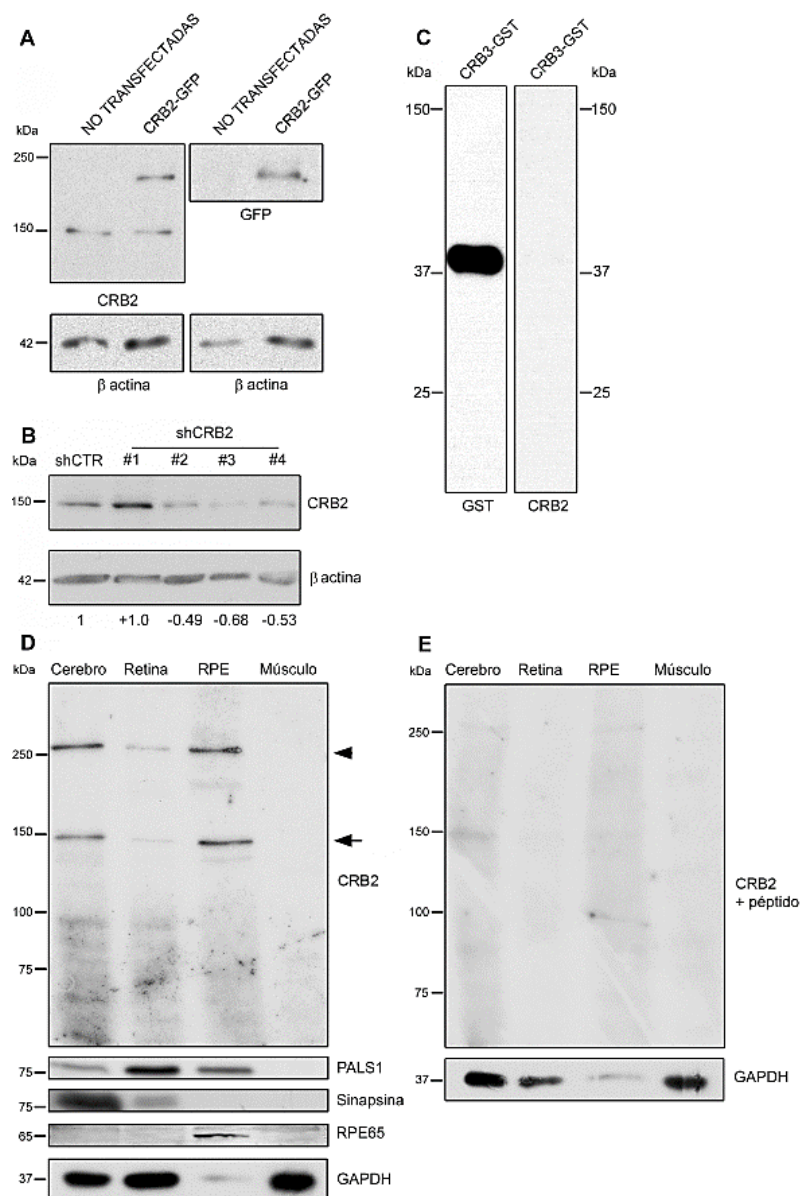


Figura 2- Caracterización de la especificidad del anticuerpo dirigido contra CRB2 y detección de la proteína CRB2 en el epitelio pigmentario. (A) El anticuerpo dirigido contra CRB2 detecta, mediante Western blot en extracto total proteínas de células HEK293, una banda a 150 kDa y otra a aproximadamente 180 kDa, en células que sobreexpresan CRB2-GFP, y que también es detectada con un anticuerpo contra GFP. β -actina empleada como control de carga. (B) La transfección de cuatro shRNAs dirigidos contra *Crb2* en células N2A, muestra que con tres de ellos (shCRB2#2-4) la expresión de la proteína detectada a 150 kDa disminuye en comparación con los niveles de expresión de células transfectadas con un shRNA control (shCTR). El shCRB2#1 no produce disminución de la expresión. Las cifras al pie de la imagen indican el número de veces que incrementa o decrece la intensidad de la banda a 150 kDa normalizada respecto a su carga, β -actina, en comparación con la del shCTR, en tres experimentos independientes. (C) La proteína CRB3-GST es detectada con un anticuerpo dirigido contra GST a 40 kDa, pero no con el anticuerpo dirigido contra CRB2. (D) El anticuerpo dirigido contra CRB2 detecta dos bandas a 150 (Flecha) y 260 kDa (Cabeza de flecha) en extracto total de proteínas de cerebro, retina y epitelio pigmentario, pero no así en músculo. El miembro del complejo Crb, PALS1, se expresa en los mismos tejidos. La detección de sinapsina en cerebro y retina, y de RPE65 en el epitelio pigmentario descarta la contaminación cruzada entre las muestras de retina neural y epitelio pigmentario. GAPDH demuestra la presencia de proteínas en el extracto de músculo. (E) En el ensayo de competitividad no se detectan las bandas a 150 y 260 kDa, en ninguno de los tejidos estudiados, lo que descarta la presencia de anticuerpos inespecíficos en el antisuero purificado y demuestra la especificidad del marcaje.

Resultados

y la del marcador específico de epitelio pigmentario, RPE65, solo en el epitelio pigmentario (**Figura 2D**), descarta la contaminación cruzada entre las muestras. Además, PALS1 corrobora la expresión del complejo Crb en estos tres tejidos y GAPDH la presencia de proteínas en la muestra de músculo (**Figura 2D**). Para descartar que el marcaje se deba a la presencia de anticuerpos inespecíficos en el antisuero realizamos un ensayo de competitividad, tras el cual no observamos las bandas a 150 y 260 kDa en ninguno de los tres tejidos (**Figura 2E**).

Por lo tanto, CRB2 se expresa en el epitelio pigmentario del ratón, donde tiene un peso molecular de, al menos 150 kDa, y posiblemente también de 260 kDa debido a algún tipo de modificación postraduccional.

1.4 Localización subcelular de CRB2 en el epitelio pigmentario

A continuación quisimos conocer la localización subcelular de CRB2 en las células de epitelio pigmentario, para lo que utilizamos técnicas de inmunofluorescencia en *Flat Mount* de epitelio pigmentario. Realizamos un doble marcaje para RPE65 (**Figura 3A**) y CRB2 (**Figura 3B**), y observamos que el anticuerpo dirigido contra CRB2 marca la membrana plasmática (**Flecha en Figura 3B y C**), además de mostrar un marcaje punteado y disperso en el citoplasma de estas células (**Cabeza de flecha en Figura 3B y C**). Para comprobar la especificidad del anticuerpo llevamos a cabo un ensayo de competitividad, en el cual observamos que desaparece la mayor parte del marcaje tanto de la membrana plasmática como del citoplasma (**Figura 3D y E**), corroborando que el anticuerpo reconoce la proteína CRB2 específicamente mediante esta técnica.

A continuación quisimos conocer la localización exacta de CRB2 en la membrana plasmática, ya que es donde las proteínas del complejo Crb llevan a cabo su función²⁰⁰. Puesto que el resto de miembros del complejo han sido localizados en la membrana apicolateral, llevamos a cabo un triple marcaje para las proteínas F-Actina (**Figura 3F**), PALS1 (**Figura 3G**), ambas localizadas en las uniones celulares, y CRB2 (**Figura 3H**), y comprobamos que las tres colocalizan en el mismo área de la membrana plasmática. Sin embargo, mientras que F-Actina y PALS1 tienen una distribución homogénea a lo largo de la membrana plasmática, CRB2 se distribuye de modo discontinuo, de manera punteada, a lo largo de esta.

Una vez comprobado que CRB2 se sitúa en la membrana apicolateral, nos propusimos averiguar en qué tipo de uniones se localiza de forma más precisa. Para ello realizamos un doble marcaje para CRB2 y para la proteína de uniones adherentes p120, y gracias a la

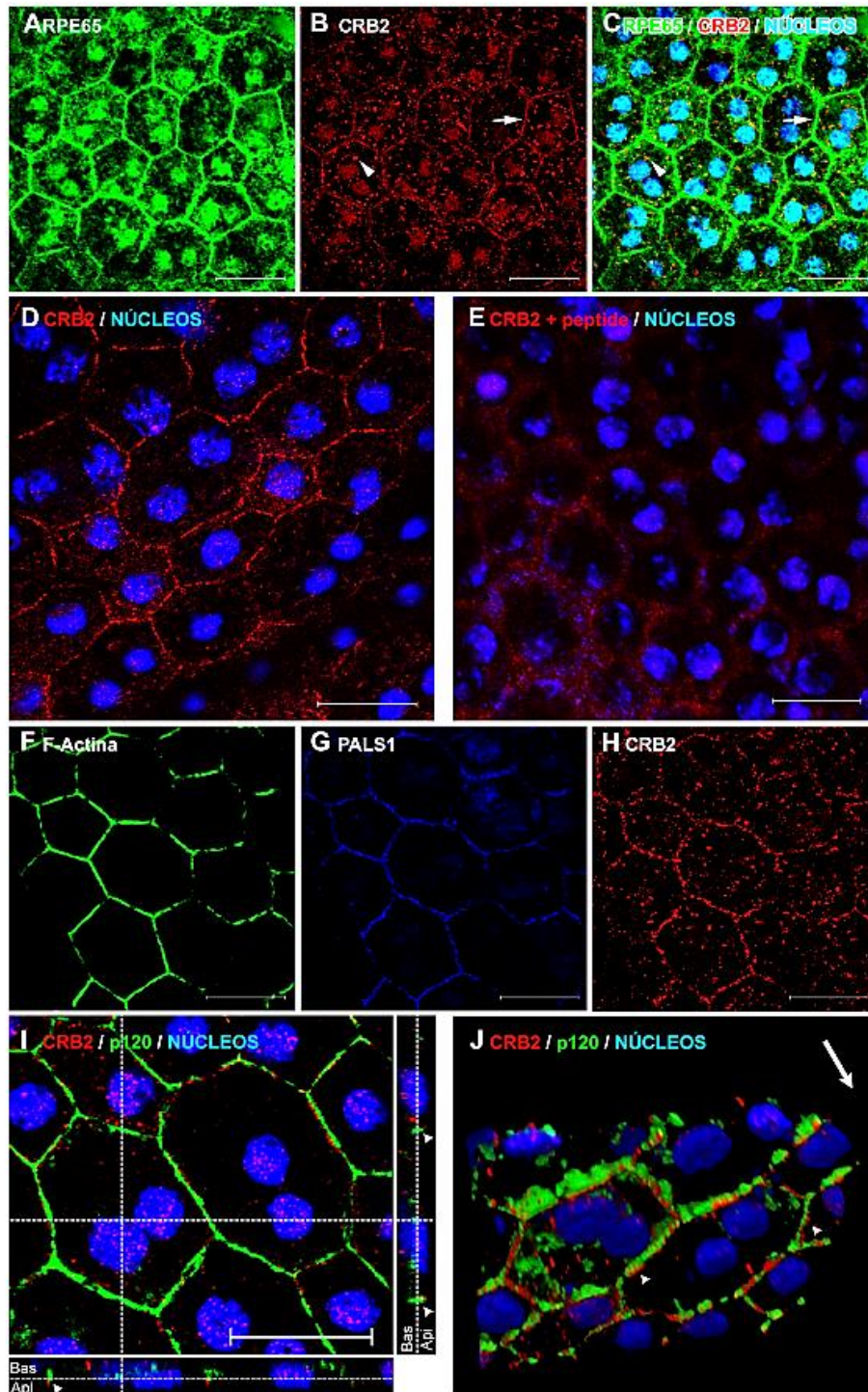


Figura 3- Localización subcelular de CRB2 en las células de epitelio pigmentario. (A-C) Imágenes de microscopía láser confocal que muestran el marcaje inmunofluorescente de RPE65 y CRB2 en células de epitelio pigmentario. CRB2 se localiza en la membrana plasmática (Flecha en B,C) y en el citoplasma (Cabeza de flecha en B,C). (D-E) El marcaje de CRB2 en la membrana plasmática no aparece tras realizar un ensayo de competitividad. (F-H) Las proteínas F-Actina, PALS1 y CRB2 colocalizan en la membrana apicolateral de las células de epitelio pigmentario. (I) La proyección máxima y la vista ortogonal de un conjunto de imágenes confocales en el plano Z muestran la localización apical de CRB2 respecto a p120 (Cabezas de flecha). (J) La reconstrucción tridimensional del conjunto de imágenes en el plano Z muestra que CRB2 se localiza apicalmente a p120. La flecha en la parte superior derecha en (J) indica la orientación desde la zona basal (cola de la flecha) hasta la apical (cabeza de flecha). Barras de escala: 20 μ m.

proyección ortogonal de un conjunto de imágenes confocales tomadas en diferentes planos del eje Z (**Figura 3I**), así como a la reconstrucción tridimensional de las mismas (**Figura 3J**) observamos que CRB2 se localiza de forma apical a p120 (**Cabezas de flecha en Figura 3I y J**), por lo que CRB2 se sitúa en las uniones ocluyentes del epitelio pigmentario.

Por lo tanto, respecto al primer objetivo concluimos que: CRB2 se expresa en las células de epitelio pigmentario maduro del ratón, donde se concentra en las uniones ocluyentes y se encuentra de forma punteada en el citoplasma.

2. CRB2 concluye el proceso de polarización y diferenciación en células de epitelio pigmentario humanas

Una vez estudiada la expresión y localización de CRB2 en las células de epitelio pigmentario maduro, abordamos el segundo objetivo de la presente tesis doctoral: caracterizar la expresión y localización de CRB2 durante el proceso de polarización y diferenciación de las células de epitelio pigmentario.

Debido a que las líneas celulares comerciales de epitelio pigmentario disponibles hasta el momento no alcanzan un alto grado de polarización y, por lo tanto, no son útiles para estudiar este proceso, decidimos desarrollar y caracterizar un nuevo cultivo de células de epitelio pigmentario humano que muestre estas características *in vitro*.

2.1 Caracterización del proceso de diferenciación y polarización de las células ChRPE en cultivo

Teniendo en cuenta que una de las principales características de las células epiteliales diferenciadas es su estado quiescente, en primer lugar quisimos conocer el número de células en proliferación en diferentes momentos del cultivo. Para ello cuantificamos el número de células positivas para Ki67, una proteína que se expresa en el núcleo de las células en todas las fases del ciclo celular salvo en G0²⁰¹. De este modo observamos que a los 7 días en cultivo (DIC) un 35 % ($\bar{X}=37,37 \% \pm 3,35$; $n=7$) de células se encuentran en proliferación (**Figura 4A,D**). Este número desciende significativamente a alrededor del 20 % ($\bar{X}=21,18 \% \pm 4,21$; $n=6$) ($p=0,012$; $n=13$) a los 14 DIC (**Figura 4A,E**), y de aquí lo hace a alrededor del 0 % ($\bar{X}=0,64 \% \pm 0,55$; $n=4$) ($p=0,006$; $n=10$) (**Figura 4A,F**) a los 21 DIC. Por lo tanto, desde los 7 a los 21 DIC se produce un descenso altamente significativo ($p=0,000$; $n=11$) del número de células en proliferación, y conforme se alcanza una densidad celular óptima, estas paran el ciclo celular y se diferencian.

Para conocer la densidad celular a lo largo de este periodo, cuantificamos el número de células por cm^2 mediante el marcaje y recuento de núcleos a los 7, 14 y 21 DIC. Así comprobamos que de las 50 000 células/ cm^2 sembradas inicialmente, el número aumenta un 120 % ($\bar{X}=126,46 \% \pm 11,04$; $n=6$) a alrededor de 100 000 células/ cm^2 ($\bar{X}=113\,232 \pm 9885$; $n=6$) a los 7 DIC (**Figura 4B,D**); de aquí otro 110 % ($\bar{X}=113,31 \% \pm 29,09$; $n=5$), a alrededor de 250 000 células/ cm^2 ($\bar{X}=241\,538 \pm 62\,009$; $n=5$) a los 14 DIC (**Figura 4B,E**); y, por último, un 25 % ($\bar{X}=27,55 \% \pm 6,13$; $n=3$) hasta alcanzar alrededor de 300 000 células/ cm^2 ($\bar{X}=308\,086 \pm 68\,544$; $n=3$) a los 21 DIC (**Figura 4B,F**). Por lo tanto, se produce un aumento significativo en la densidad celular entre los 7 y los 21 DIC ($p=0,049$; $n=9$), que es mucho más acusada entre los 0 y los 14 DIC y que se ralentiza desde los 14 a los 21 DIC.

A continuación analizamos la capacidad del cultivo para actuar como barrera fisicoquímica, tal y como lo hace en condiciones fisiológicas normales un tejido epitelial. Para ello medimos la resistencia eléctrica transepitelial (TER), que es la resistencia eléctrica que ejerce el epitelio al paso de los iones entre la cámara apical y la basal y que, en consecuencia, es una medida indirecta del estado de formación las uniones celulares. La TER a los 7 DIC es de alrededor de $20 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\bar{X}=21,02 \pm 0,98$, $n=32$), asciende significativamente a alrededor de $35 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\bar{X}=34,91 \pm 1,39$, $n=24$) ($p=0,000$; $n=56$) a los 14 DIC e incrementa considerablemente hasta alcanzar alrededor de $90 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\bar{X}=90,60 \pm 7,76$, $n=18$) ($p=0,004$; $n=42$) a los 21 DIC (**Figura 4C**). Por lo tanto el cultivo incrementa paulatinamente su efectividad en el cierre del paso paracelular a los iones desde los 7 a los 21 DIC ($p=0,000$; $n=50$).

Para evaluar el estado de polarización celular, estudiamos la distribución de los filamentos de Actina a lo largo de los 21 días de cultivo, ya que el establecimiento del cinturón de Actina que rodea el contorno de la célula epitelial es uno de los primeros signos de polarización de este tipo celular. Para ello, marcamos la F-Actina, la Actina que forma parte de microfilamentos, con la molécula fluorescente Faloidina-FITC, y observamos que a los 7 DIC muchos de los filamentos de Actina atraviesan el citoplasma de las células (**Figura 4G**), mientras que a los 14 DIC la mayor parte de los filamentos se acumulan junto a la membrana plasmática, aunque algunos aún atraviesan el citoplasma de las células (**Figura 4H**) y, finalmente, a los 21 DIC, prácticamente la totalidad de las células presentan un cinturón de Actina perfectamente formado que delimita la membrana plasmática (**Figura 4I**).

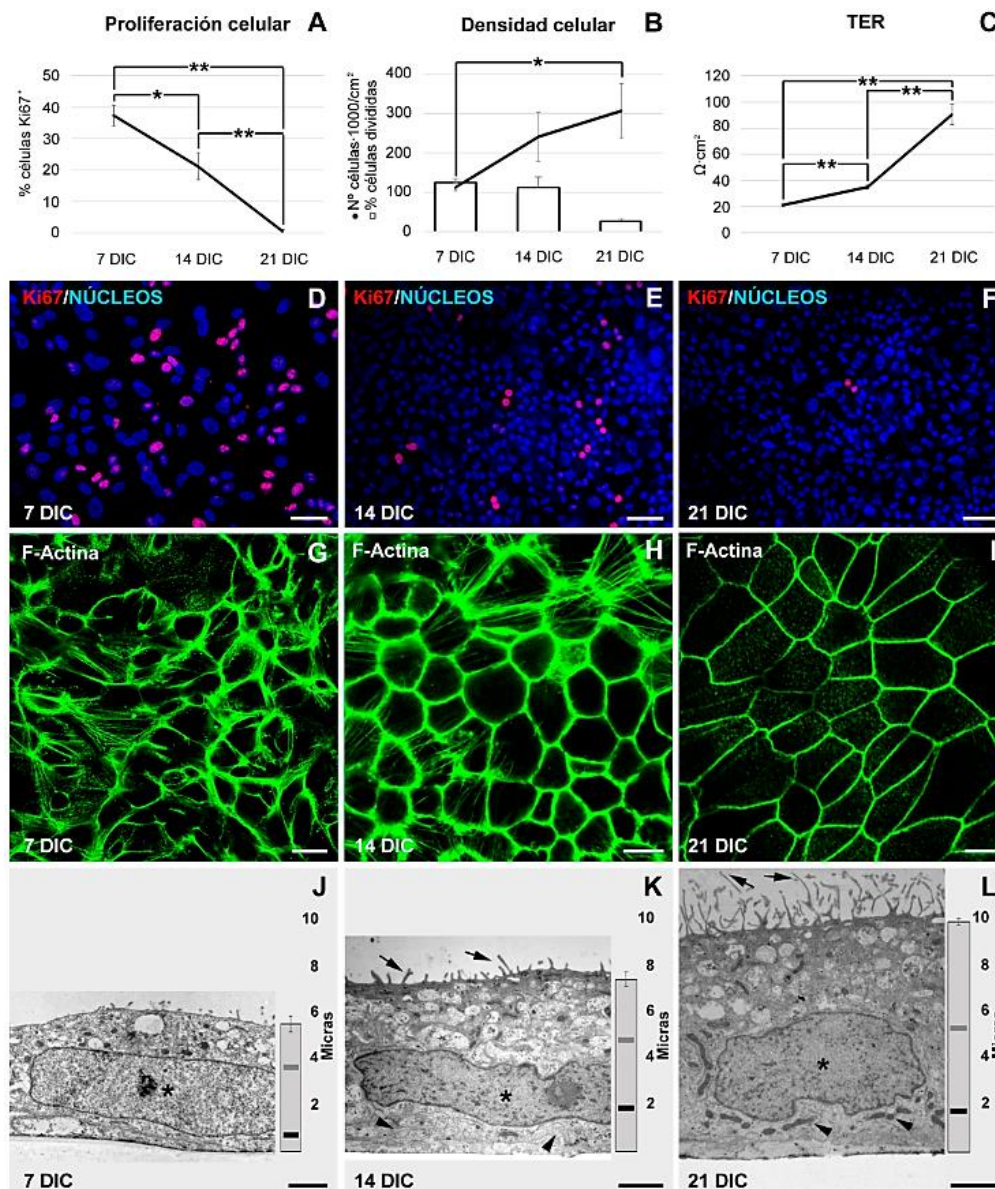


Figura 4- Caracterización del desarrollo morfofisiológico del cultivo de células ChrPE. (A) Representación gráfica de la disminución del porcentaje medio de células en división desde los 7 a los 21 DIC. (B) Representación en un gráfico combinado de líneas, que muestra el aumento de la densidad media de células en cultivo desde los 7 a los 21 DIC, y de barras, mostrando la disminución en el porcentaje de células que se han dividido en los 7 días previos a cada momento analizado. (C) Representación gráfica del aumento de la TER media desde los 7 a los 21 DIC. (D-F) Imágenes de epifluorescencia de células ChrPE en cultivo teñidas para el marcador de proliferación celular Ki67 (en rojo) y los núcleos con DAPI (en azul), mostrando la densidad celular y el número de células en proliferación a los 7, 14 y 21 DIC. (G-I) Imágenes de microscopía láser confocal del marcaje inmunofluorescente de F-Actina a los 7, 14 y 21 DIC, empleado para mostrar la organización progresiva del cinturón de Actina adyacente a la membrana plasmática de las células. (J-L) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de la ultraestructura general de las células mostrando el incremento en la altura media de las células, el posicionamiento basal del núcleo (Asterisco en J-L), la formación del laberinto basal (Cabezas de flecha en K), la aparición y desarrollo de microvellosidades en la zona apical (Flechas en K,L) y el posicionamiento basal a 21 DIC de las mitocondrias (Cabezas de flecha en L). Barras de error en (A-C, J-L): error estándar de la media. * en (A,B): p valor < 0,05. ** en (A,C): p valor < 0,01. Barras de escala en (D-F): 50 µm; (G-I): 10 µm; (J-L): 2 µm. Barra vertical en (J-L): altura media de las células. Barra horizontal gris en (J-L): posición relativa media del límite apical del núcleo. Barra horizontal negra en (J-L): posición relativa media del límite basal del núcleo.

Puesto que la disposición de los filamentos de Actina sugiere que la célula es capaz de alcanzar cierta madurez en el grado de polarización tras 21 DIC, nos propusimos analizar la organización ultraestructural de las células mediante microscopía electrónica de transmisión. En primer lugar cuantificamos la altura media de las células en cultivo y observamos que esta es de alrededor de 5 μm ($\bar{X}=5,46 \pm 0,34$, $n=15$) a los 7DIC (**Figura 4J**), incrementa significativamente a unas 7 μm ($\bar{X}=7,35 \pm 0,30$, $n=15$) ($p=0,000$; $n=30$) a los 14 DIC (**Figura 4K**), y a alrededor de 10 μm ($\bar{X}=9,90 \pm 0,15$, $n=62$) ($p=0,004$; $n=77$) a los 21DIC (**Figura 4L**). Por lo tanto, se produce un incremento progresivo en la altura media de las células durante el desarrollo del cultivo desde los 7 a los 21 DIC ($p=0,000$; $n=77$). Además, observamos cambios en la presencia y distribución de orgánulos y otras estructuras durante este periodo. Así comprobamos cómo, a los 7 DIC, el núcleo (**Asterisco en Figura 4J**), con morfología fusiforme típica de células aplanadas, ocupa la mayor parte del citoplasma de las células que, además, no presentan una distribución polarizada de orgánulos u otros elementos celulares (**Figura 4J**). A partir de los 14 DIC aparecen algunos signos de polaridad, como la localización basal del núcleo (**Asterisco en Figura 4K**), la presencia de microvellosidades en la membrana apical (**Flechas en Figura 4K**) o la aparición de un laberinto basal en la membrana basal (**Cabezas de flecha en Figura 4K**). La polarización de estas estructuras se mantiene y algunas de ellas se desarrollan aún más hasta los 21 DIC, como las microvellosidades, que alcanzan una mayor longitud (**Flechas en Figura 4L**), el núcleo, que adquiere forma redondeada propia de células epiteliales cúbicas (**Asterisco en Figura 4L**), y las mitocondrias, que se posicionan en la zona basal junto al núcleo (**Cabezas de flecha en Figura 4L**).

Una de las características que mejor definen el grado de polaridad apicobasal de la célula epitelial es la aparición de uniones intercelulares, por lo que analizamos su presencia en los cultivos a los diferentes tiempos. Mediante análisis por Western blot observamos que la proteína de las uniones adherentes β -catenina se expresa durante todo el periodo de cultivo analizado, desde los 7 hasta los 21 DIC (**Figura 5**). Sin embargo, la proteína de las uniones

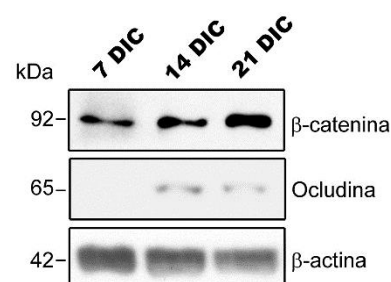


Figura 5- Caracterización de la expresión de las proteínas de las uniones celulares en el desarrollo del cultivo de células ChrPE. Análisis mediante Western blot de extracto total de proteínas de las células ChrPE en cultivo mostrando que la proteína de uniones adherentes β -catenina se expresa desde los 7 DIC y sus niveles de expresión se incrementan ligeramente hasta los 21 DIC. La proteína de uniones ocluyentes, Ocludina, está presente en los cultivos desde los 14 DIC y los niveles de expresión se mantienen estables hasta los 21 DIC. β -actina empleada como control de carga.

Resultados

ocluyentes Ocludina, sólo se expresa desde los 14 DIC en adelante (**Figura 5**). Puesto que la expresión de estas proteínas no es el único requisito para la formación de las uniones celulares, sino que también lo es su localización en la membrana plasmática, seguidamente analizamos su localización subcelular mediante marcaje por inmunofluorescencia. De este modo observamos que β -catenina se encuentra delimitando de manera discontinua la membrana plasmática de las células a los 7 DIC (**Figura 6A**). A los 14 DIC, la proteína se distribuye por todo el contorno de la membrana plasmática (**Figura 6B**). Finalmente, a los 21 DIC el marcaje define completamente la membrana plasmática revelando claramente la morfología epitelial (**Figura 6C**). A continuación estudiamos la localización de ZO-1 que, como mencionamos en el apartado de Introducción, es utilizada habitualmente como marcador de las uniones ocluyentes²⁰, aunque se conoce que durante el proceso de polarización, inicialmente se localiza en las uniones adherentes²¹. Así, hemos observado que ZO-1 se encuentra en la membrana plasmática de forma parcheada desde los 7 DIC (**Figura 6D**), y delimita perfectamente el contorno celular desde los 14 DIC en adelante (**Figura 6E,F**). Para aclarar este proceso, estudiamos la localización de Ocludina que, desde nuestro conocimiento, sólo ha sido detectada en las uniones ocluyentes. A los 7 DIC, detectamos un fuerte marcaje con el anticuerpo para Ocludina en el nucleolo (**Figura 6G**), que presumimos es inespecífico ya que mediante Western blot no se detecta la expresión de esta proteína en este estadio (**Figura 5**). Sin embargo, a partir de los 14 DIC observamos marcaje en la membrana plasmática (**Figura 6H**), que es más intenso a los 21 DIC, cuando la proteína delimita perfectamente el contorno celular (**Figura 6I**). Por último quisimos corroborar la presencia de los dos tipos de uniones celulares mediante microscopía electrónica de transmisión. De este modo comprobamos que, a los 7 DIC están presentes las uniones adherentes (**Flechas en Figura 6J**), pero no así las ocluyentes; a los 14 DIC encontramos conjuntamente uniones adherentes (**Flechas en Figura 6K**) y ocluyentes (**Cabezas de flecha en Figura 6K**); finalmente, a los 21 DIC ambos tipos de uniones, adherentes (**Flechas en Figura 6L**) y ocluyentes (**Cabezas de flecha en Figura 6L**) se encuentran más desarrolladas.

Por lo tanto, las células ChrPE en cultivo sufren un proceso gradual de diferenciación y polarización que dura 21 días, tras los cuales presentan características propias de un epitelio maduro.

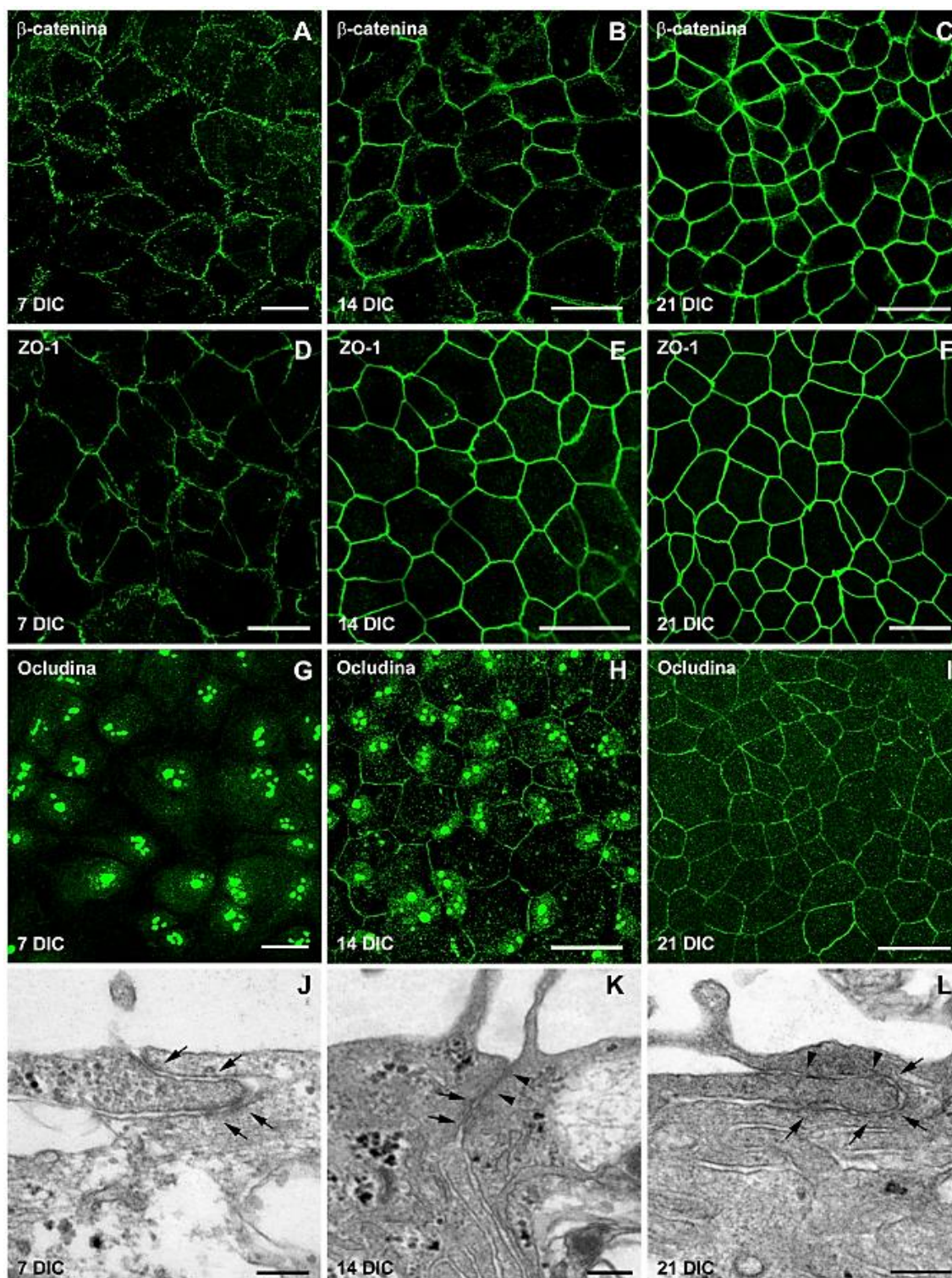


Figura 6- Estudio de la localización subcelular de las proteínas de las uniones celulares en el desarrollo del cultivo de células ChRPE. (A-C) Imágenes de microscopía láser confocal que muestran el marcaje por inmunofluorescencia de la proteína de las uniones adherentes β -catenina localizada en la membrana plasmática desde los 7 DIC en adelante, (D-F) al igual que la proteína ZO-1. (G-I) La proteína de las uniones ocluyentes Occludina se localiza en la membrana plasmática desde los 14 DIC en adelante. (J-L) Las micrografías de microscopía electrónica de transmisión muestran la presencia de las uniones adherentes desde los 7 DIC (Flechas en J, K y L) y de uniones ocluyentes desde los 14 DIC en adelante (Cabezas de flecha en K y L). Barras de escala en (A-I): 25 μ m; (J-L): 200 nm.

2.2 Estudio de la formación de los complejos de polaridad apical Par y Crb durante el proceso de diferenciación y polarización de las células ChRPE

Una vez confirmado y descrito el proceso de diferenciación y polarización de las células ChRPE en cultivo, quisimos conocer el momento en el que se expresan las proteínas de polaridad apical y se forman los complejos durante el mismo. Para ello realizamos en primer lugar un análisis mediante Western blot de la expresión de PAR3, una de las proteínas del complejo Par, y de las proteínas del complejo Crb, PALS1 y CRB2. De esta manera observamos que la proteína PAR3 se expresa durante todo el proceso, desde los 7 hasta los 21 DIC (**Figura 7**). Sin embargo, PALS1 y CRB2 solo se expresan desde los 14 DIC en adelante (**Figura 7**).

Debido a que las funciones descritas hasta la fecha de la mayoría de las proteínas de polaridad apical estudiadas se desarrollan en la membrana plasmática, cuando entran a formar parte de los complejos⁵⁶, quisimos conocer la localización subcelular de estas proteínas durante el proceso de polarización. Para ello realizamos en primer lugar un marcaje inmunofluorescente de las proteínas del complejo Par: PAR3 y aPKC. De este modo observamos que PAR3 se localiza en la membrana plasmática durante todo el proceso, desde los 7 DIC en adelante (**Figura 8A-C**). Algo similar ocurre con la proteína aPKC, aunque el marcaje de membrana es algo más difuso, sobre todo a los 7 DIC (**Figura 8D**), pero delimita de forma precisa la membrana plasmática desde los 14 DIC en adelante (**Figura 8E, F**). A continuación estudiamos la localización de las proteínas del complejo Crb: PATJ, PALS1 y CRB2. PATJ, a los 7 DIC se encuentra formando estructuras en forma de ovillo en el citoplasma de las células (**Figura 8G**). A los 14 DIC la mayor parte de la proteína se encuentra en la membrana plasmática aunque algunas células aún presentan las estructuras en forma de ovillo (**Figura 8H**). Finalmente, a los 21 DIC, se encuentra principalmente en la membrana plasmática y, aunque sigue estando también en el citoplasma,

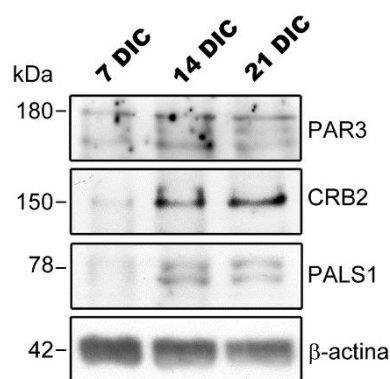


Figura 7- Caracterización de la expresión de las proteínas de los complejos de polaridad apical en el desarrollo del cultivo de células ChRPE. El análisis mediante Western blot de extracto total de proteínas de las células ChRPE en cultivo muestra que la proteína del complejo Par, PAR3, se expresa desde los 7 DIC en adelante y sus niveles se mantienen constantes hasta los 21 DIC. Las proteínas del complejo Crb, PALS1 y CRB2 se expresan desde los 14 DIC y sus niveles de expresión se mantienen estables hasta los 21 DIC. β-actina empleada como control de carga.

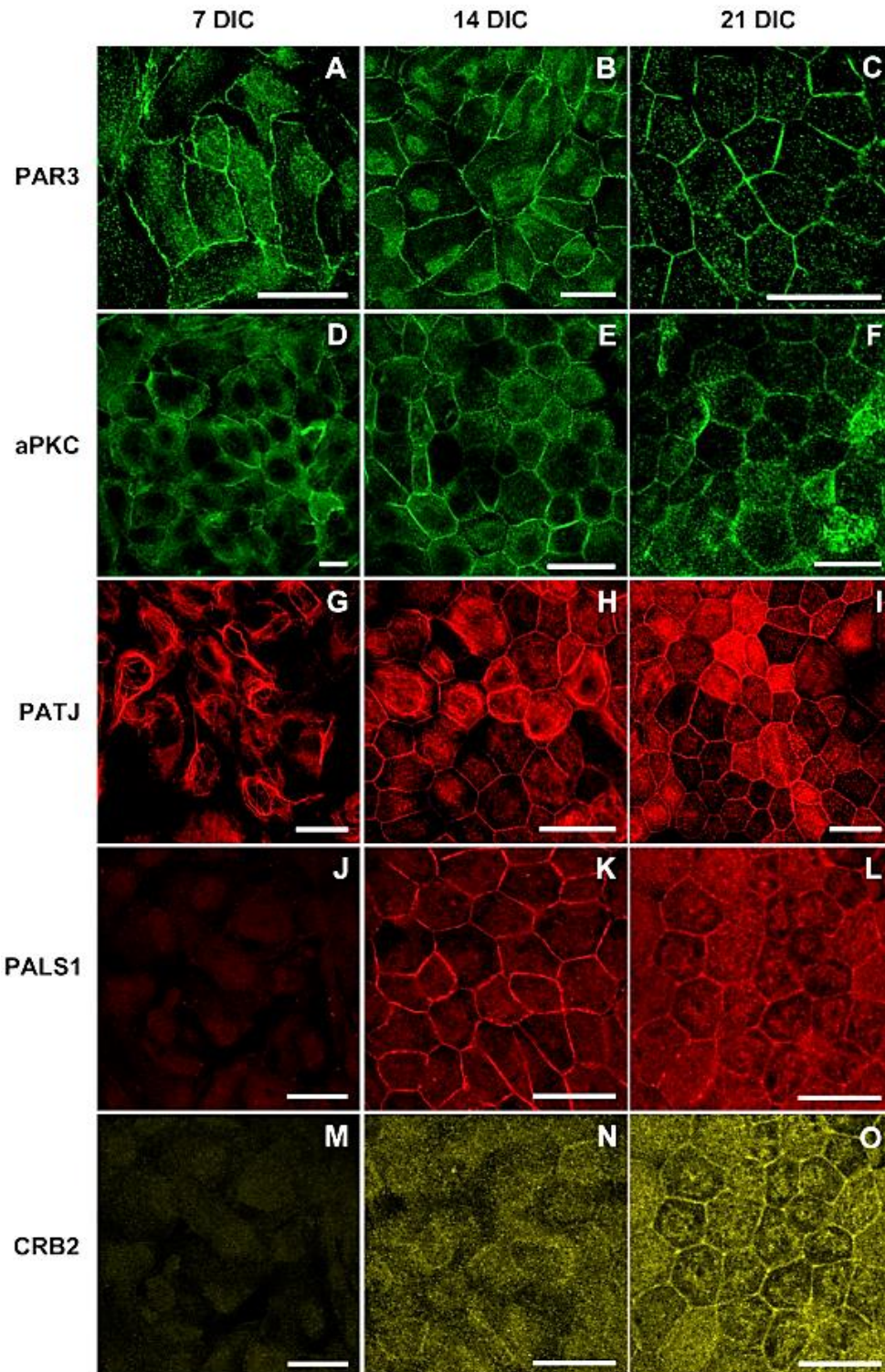


Figura 8- Estudio de la localización subcelular de las proteínas de los complejos de polaridad apical en el cultivo de células ChrPE. (A-F) Imágenes de microscopía láser confocal que muestran el marcaje por inmunofluorescencia de las proteínas del complejo Par, PAR3 y aPKC, localizadas en la membrana plasmática desde los 7 DIC en adelante. **(G-I)** La proteína del complejo Crb, PATJ, se localiza en el citoplasma a los 7 DIC, y en la membrana plasmática desde los 14 DIC en adelante. **(J-L)** La proteína del complejo Crb, PALS1, se expresa y localiza en la membrana plasmática desde los 14 DIC en adelante. **(M-O)** La expresión de CRB2, también del complejo Crb, comienza a los 14 DIC, cuando se localiza en el citoplasma, y se sitúa en la membrana plasmática a los 21 DIC. Barras de escala: 25 μ m.

desaparece la distribución en forma de ovillo (**Figura 8I**). En cuanto a PALS1, al igual que comprobamos mediante Western blot, su expresión comienza a partir de los 14 DIC en adelante, y ya desde entonces se localiza exclusivamente en la membrana plasmática (**Figura 8J-L**). CRB2, se expresa también a partir de los 14 DIC, pero inicialmente se detecta de forma difusa en el citoplasma, y es sólo a partir de los 21 DIC cuando se localiza con precisión en la membrana plasmática (**Figura 8M-O**). Por lo tanto, la expresión y localización en la membrana plasmática de las proteínas del complejo Par es anterior a la del complejo Crb, y coinciden temporalmente con el establecimiento de las uniones adherentes y ocluyentes respectivamente, con la excepción de CRB2 que es más tardía y se sitúa en la membrana plasmática en el momento de mayor polarización y diferenciación de la célula.

Respecto al segundo objetivo de la presente tesis doctoral podemos concluir que: la expresión de CRB2 durante el proceso de polarización coincide con el momento de establecimiento de las uniones ocluyentes. Sin embargo, su localización en la membrana plasmática es posterior, y coincide con el momento de mayor diferenciación y polarización de las células ChrPE en cultivo.

2.3 Análisis de los efectos del silenciamiento de CRB2 sobre la diferenciación y polarización de las células ChrPE

A continuación abordamos el tercer objetivo de la presente tesis doctoral, que consiste en analizar el papel de CRB2 durante el proceso de polarización y diferenciación de las células de epitelio pigmentario. Para ello silenciamos la proteína con dos secuencias de shRNA diferentes (shCRB2#1 y shCRB2#2) en cultivos de células ChrPE independientes y analizamos sus efectos sobre varias características celulares a lo largo del proceso, comparados con los de un shRNA control (shCTR).

Dado que detectamos la expresión de CRB2 a partir de los 14 DIC, comenzamos el análisis de los efectos que puede producir el silenciamiento en la diferenciación y polarización a partir de este estadio del cultivo. En primer lugar comprobamos mediante Western blot la efectividad en el silenciamiento de CRB2 mediante el uso de los dos shCRB2 (**Figura 9A**) y observamos que éste no tiene ningún efecto sobre los niveles de expresión de β -catenina, Ocludina, PAR3 y PALS1 a los 14 DIC, al compararlos con los niveles de expresión de estas proteínas en células infectadas con el shCTR (**Figura 9A**). A continuación investigamos si el silenciamiento de CRB2 tiene algún efecto en la diferenciación celular. Sin embargo, el recuento de células positivas para Ki67 indica que no existen diferencias significativas entre las células infectadas con el shCTR y los shCRB2#1

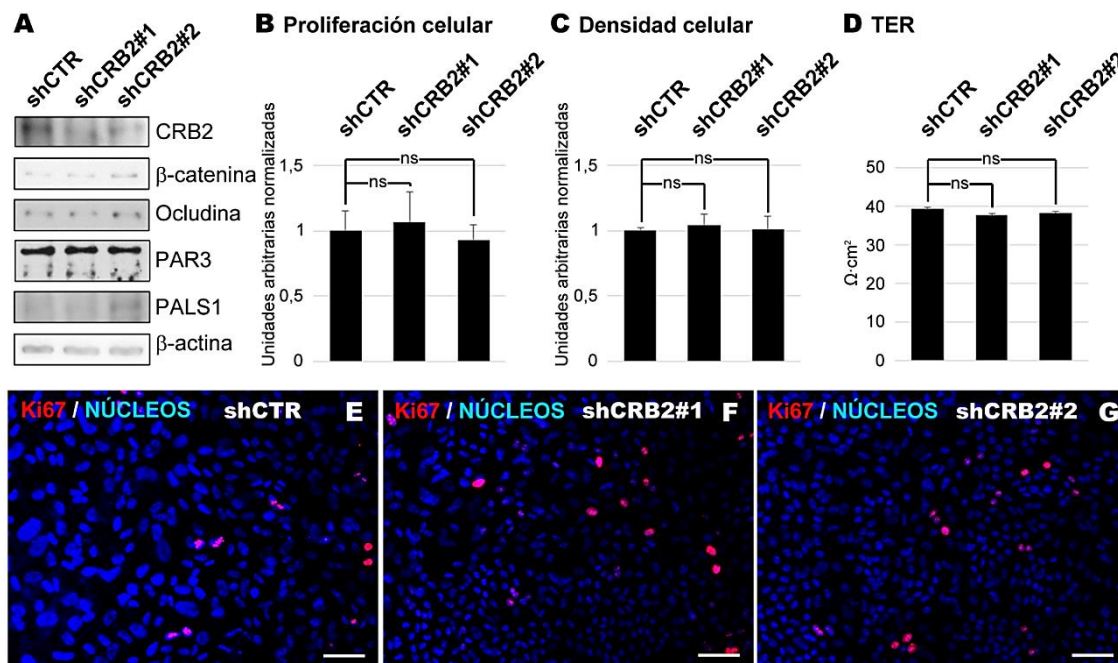


Figura 9- Caracterización de los efectos del silenciamiento de CRB2 en la diferenciación de las células ChrPE a 14 DIC. (A) Análisis mediante Western blot mostrando el silenciamiento de CRB2 con los shCRB2#1 y shCRB2#2 transcurridos 14 DIC. Este silenciamiento no produce cambios en los niveles de expresión de β-catenina, Ocludina, PAR3 o PALS1 al compararlos con el shCTR. (B) Representación gráfica mostrando que no existen diferencias significativas en el número de células en división, normalizado respecto al shCTR, (C) ni en la densidad celular del cultivo, (D) ni en la TER, entre los diferentes grupos experimentales. (E-G) Imágenes de epifluorescencia de células ChrPE en cultivo infectadas con los shCTR, shCRB2#1 y shCRB2#2 y teñidas para el marcador de proliferación celular Ki67 (en rojo) y los núcleos con DAPI (en azul), mostrando que no existen diferencias en la densidad celular ni en el número de células en división entre los diferentes grupos experimentales. Barras de error en (B-D): error estándar de la media. ns en (B-D): p valor > 0,05; Barras de escala en (E-G): 50 μm.

y shCRB2#2 ($p=0,876$; $n=16$) (Figura 9B,E-G), ni en la densidad celular ($p=0,933$; $n=18$) (Figura 9C,E-G), ni en la medida de la TER ($p=0,766$; $n=86$) (Figura 9D). Aunque no se aprecian cambios sustanciales en estas medidas entre las diferentes condiciones experimentales, analizamos la localización subcelular de las proteínas de las uniones celulares y de los complejos de polaridad apical tras el silenciamiento de CRB2. Así observamos que β-catenina (Figura 10A), Ocludina (Fig10B), PAR3 (Figura 10C) y PALS1 (Figura 10D) se encuentran en la membrana plasmática tanto en las células infectadas, que se aprecian en verde porque expresan la proteína GFP, con los dos shCRB2 como en las infectadas con el shCTR, por lo que el silenciamiento de CRB2 a los 14 DIC no produce cambios en la formación de las uniones celulares ni en el establecimiento de los complejos de polaridad apical.

Para comprobar los efectos del silenciamiento de CRB2 una vez finalizado el proceso de polarización y diferenciación, analizamos estos mismos parámetros en las células ChrPE a los 21 DIC, cuando la proteína CRB2 se localiza finalmente en la membrana plasmática. En primer lugar observamos mediante Western blot que el silenciamiento de CRB2 no tiene

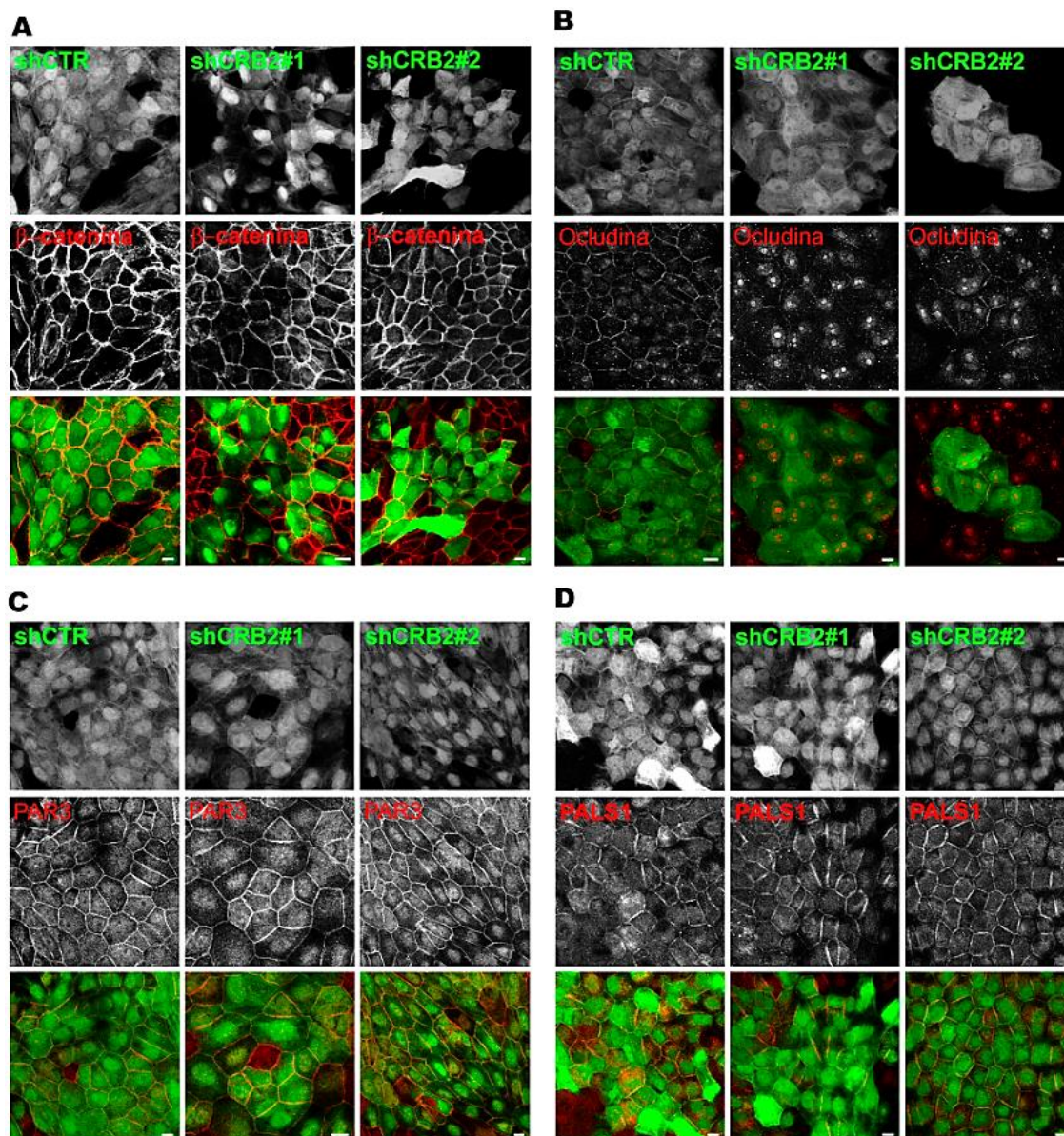


Figura 10- Estudio de los efectos del silenciamiento de CRB2 a 14 DIC en la localización subcelular de proteínas de las uniones celulares y de los complejos de polarización apical. Imágenes de microscopía láser confocal mostrando que el marcaje por inmunofluorescencia de **(A)** β -catenina, **(B)** Ocludina, **(C)** PAR3, **(D)** y PALS1, en la membrana plasmática a los 14 DIC es similar entre las células infectadas (en verde) con el shCTR, con el shCRB2#1 y con el shCRB2#2. Barras de escala: 10 μ m.

ningún efecto en los niveles de expresión de β -catenina, Ocludina, PAR3 y PALS1 a los 21 DIC (**Figura 11A**). Sin embargo, sí observamos un incremento significativo en el número de células en proliferación de aproximadamente 2,5 veces ($\bar{X}=2,54 \pm 0,84$, $n=10$) en los cultivos infectados con el shCRB2#1 ($p=0,015$; $n=20$) y de aproximadamente 2 veces ($\bar{X}=1,86 \pm 0,28$, $n=10$) en los cultivos infectados con el shCRB2#2, al compararlos con el número de células en proliferación de los cultivos infectados con el shCTR ($\bar{X}=1,00 \pm 0,14$, $n=10$) ($p=0,013$; $n=20$), pero no así entre los infectados con ambos shCRB2 ($p=0,959$; $n=20$) (**Figura 11B,E-G**). A pesar de este aumento en la proliferación no encontramos

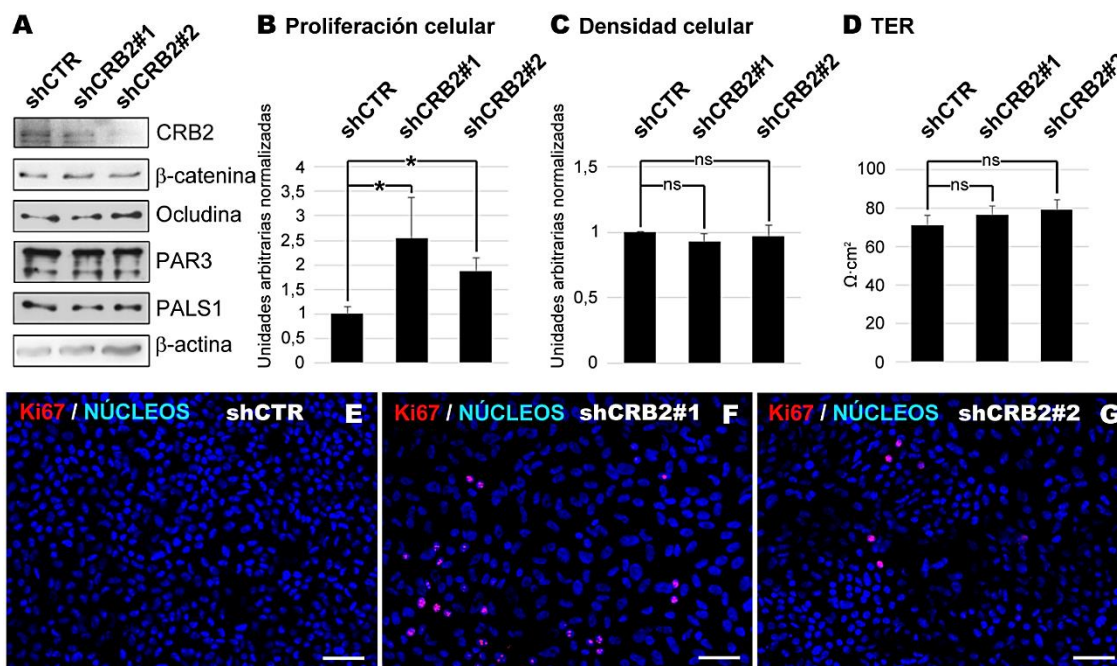


Figura 11- Caracterización de los efectos del silenciamiento de CRB2 en la diferenciación de las células ChrPE a 21 DIC. (A) Análisis mediante Western blot mostrando el silenciamiento de CRB2 con los shCRB2#1 y shCRB2#2 transcurridos 21 DIC. Este silenciamiento no produce cambios en los niveles de expresión de β-catenina, Ocludina, PAR3 o PALS1 al compararlos con el shCTR. (B) Representación gráfica del número de células en división normalizado respecto al shCTR, mostrando que existe una mayor proliferación en los cultivos en los que se ha silenciado CRB2 con los shCRB2#1 y shCRB2#2. (C) Representación gráfica mostrando que no existen diferencias significativas en la densidad celular del cultivo, normalizada respecto al shCTR, (D) ni en la TER, entre los diferentes grupos experimentales. (E-G) Imágenes de epifluorescencia de células ChrPE en cultivo infectadas con los shCTR, shCRB2#1 y shCRB2#2 y teñidas para el marcador de proliferación celular Ki67 (en rojo) y los núcleos con DAPI (en azul), mostrando que la densidad celular es similar entre los tres grupos experimentales, pero la proliferación es mayor en los que se ha silenciado CRB2. Barras de error en (B-D): error estándar de la media. Barras de escala en (E-G): 50 μm.

diferencias en la densidad celular entre los cultivos infectados con los tres shRNAs ($p=0,695$; $n=30$) (**Figura 11C,E-G**), ni en el TER ($p=0,403$; $n=165$) (**Figura 11D**). Por último, comparamos la localización subcelular de las proteínas de las uniones celulares y de los complejos de polaridad en las células con CRB2 silenciada y las infectadas con shCTR. De este modo observamos que el silenciamiento de CRB2 a 21 DIC no produce cambios en la localización en la membrana plasmática de β-catenina (**Figura 12A**), pero sí de Ocludina, cuyo marcaje es sustancialmente más débil en las células silenciadas en comparación con las infectadas con el shCTR (**Figura 12B**). Tampoco observamos diferencias en la localización en la membrana plasmática de PAR3 (**Figura 12C**) pero sí de PALS1, cuyo marcaje es parcheado en la membrana plasmática de las células con CRB2 silenciada en comparación con el marcaje continuo en las células infectadas con el shCTR (**Figura 12D**). Por lo tanto, el silenciamiento de CRB2 a los 21 DIC causa una mayor proliferación celular y la localización aberrante de la proteína Ocludina y PALS1 en la membrana plasmática.

Resultados

Podemos concluir respecto al tercer objetivo de la presente tesis doctoral que la llegada de CRB2 a la membrana plasmática es determinante para el mantenimiento de las uniones ocluyentes y del complejo Crb en la membrana plasmática, así como para la salida del ciclo celular de algunas células durante la finalización del proceso de polarización y diferenciación.

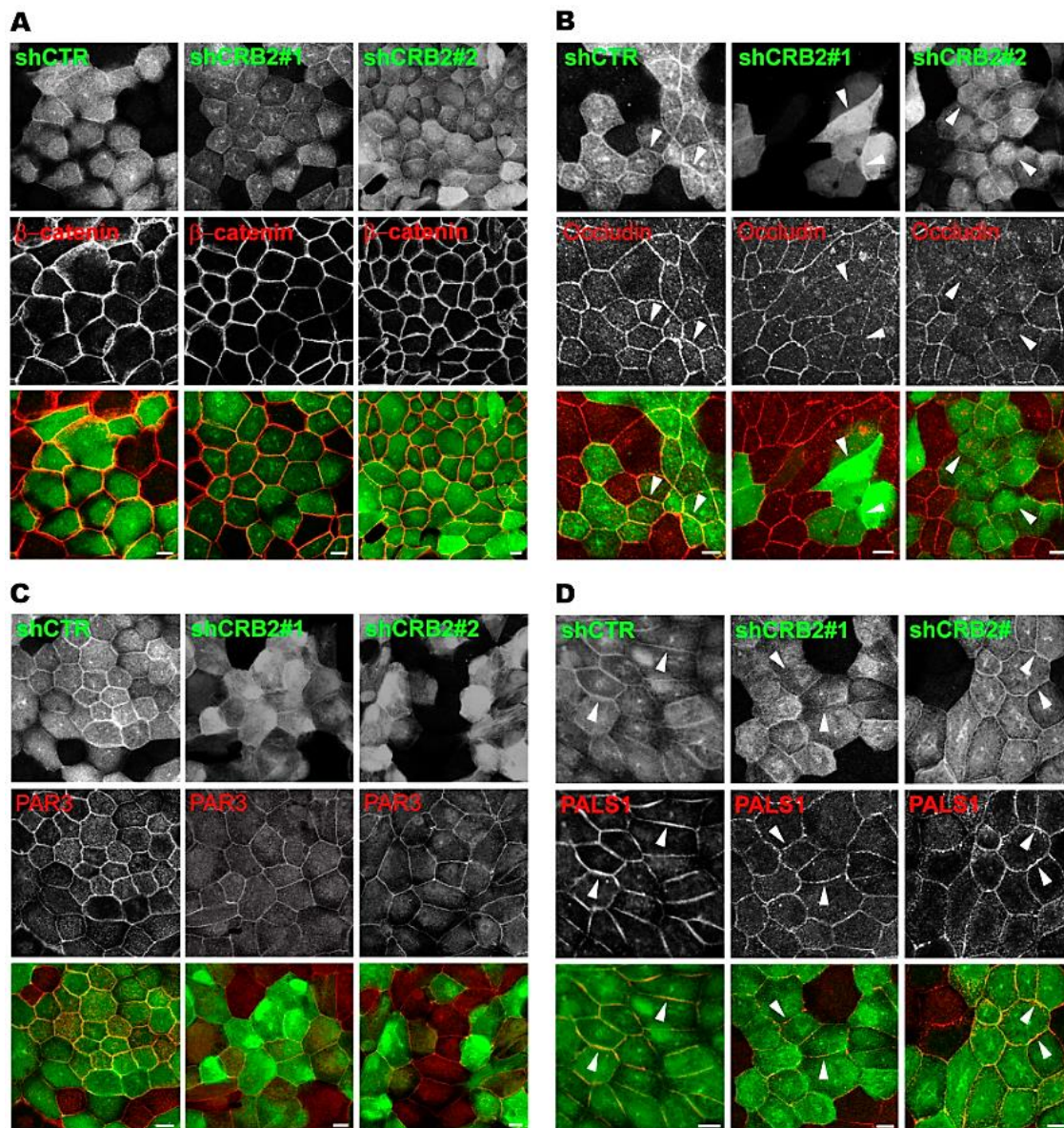


Figura 12- Estudio de los efectos del silenciamiento de CRB2 a 21 DIC en la localización subcelular de proteínas de las uniones celulares y de los complejos de polaridad apical. Imágenes de microscopía láser confocal mostrando que el marcaje por inmunofluorescencia de **(A)** β -catenina y **(C)** PAR3 en la membrana plasmática a los 21 DIC es similar entre las células infectadas (en verde) con el shCTR, con el shCRB2#1 y con el shCRB2#2. **(B)** Sin embargo, sí existen diferencias en la localización de Occludina entre las células infectadas con el shCTR, donde se localiza en la membrana plasmática (Cabezas de flecha), y las células en las que se ha silenciado CRB2 con el shCRB2#1 o con el shCRB2#2, donde su localización en la membrana plasmática es difusa, llegando a desaparecer en algunos casos (Cabezas de flecha). **(D)** También existen diferencias en la localización de PALS1 entre las células infectadas con el shCTR, donde tiene una distribución continua en la membrana plasmática (Cabezas de flecha) y las células en las que se ha silenciado CRB2 con el shCRB2#1 o con el shCRB2#2, donde se localiza de forma punteada en la membrana plasmática (Cabezas de flecha). Barras de escala: 10 μ m.

3. CRB2 es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis del epitelio pigmentario

Por último abordamos el cuarto objetivo de la presente tesis doctoral: estudiar el papel de CRB2 en el epitelio pigmentario *in vivo*. Para ello silenciamos la proteína CRB2 en este tipo celular mediante inyecciones subretinales de vectores lentivirales portadores de un shRNA dirigido contra el mRNA de CRB2 (shCRB2). Seleccionamos la secuencia en la que observamos el mayor nivel de silenciamiento en las células N2A (shCRB2#3) (**Figura 2B**) y analizamos y comparamos sus efectos con los de un shRNA control (shCTR), a los 60 días posinyección (DPI).

3.1 Análisis de la efectividad del método de silenciamiento

En primer lugar analizamos la eficiencia de infección de las células de epitelio pigmentario mediante esta técnica. Para ello, cuantificamos, en *Flat Mounts* de epitelio pigmentario, el porcentaje de área ocupada por las células infectadas, que expresan la proteína GFP, respecto del área total del *Flat Mount*. De este modo calculamos que el área de infección ocupa una media del 10 % del área del epitelio pigmentario ($\bar{x}=9,62 \pm 1,80$, $n=15$), y que no existen diferencias significativas entre el área infectada por los vectores con el shCTR y el shCRB2 ($p=0,203$; $n=15$) (**Figura 13A**). A continuación marcamos mediante inmunofluorescencia la proteína RPE65, que se expresa exclusivamente en el epitelio pigmentario, y observamos que los vectores lentivirales son capaces de infectar este tipo celular (**Figura 13B, C, Cabeza de flecha en C'**), pero no otros tipos celulares de la retina (**Flecha en Figura 13C'**).

Por lo tanto, el método empleado permite infectar específicamente las células de epitelio pigmentario en un área suficientemente extensa como para poder analizar posibles efectos celulares del silenciamiento de CRB2.

3.2 Estudio de los efectos del silenciamiento de CRB2 en el epitelio pigmentario

Para analizar los efectos que produce el silenciamiento de CRB2 en las propias células de epitelio pigmentario, en primer lugar estudiamos el estado de las uniones celulares mediante el marcaje por inmunofluorescencia de ZO-1. Aunque no encontramos diferencias en la localización de esta proteína entre células infectadas con el shCTR y el shCRB2 (**Figura 13D, D'**), sí que se aprecian diferencias en su morfología, ya que, mientras que las células

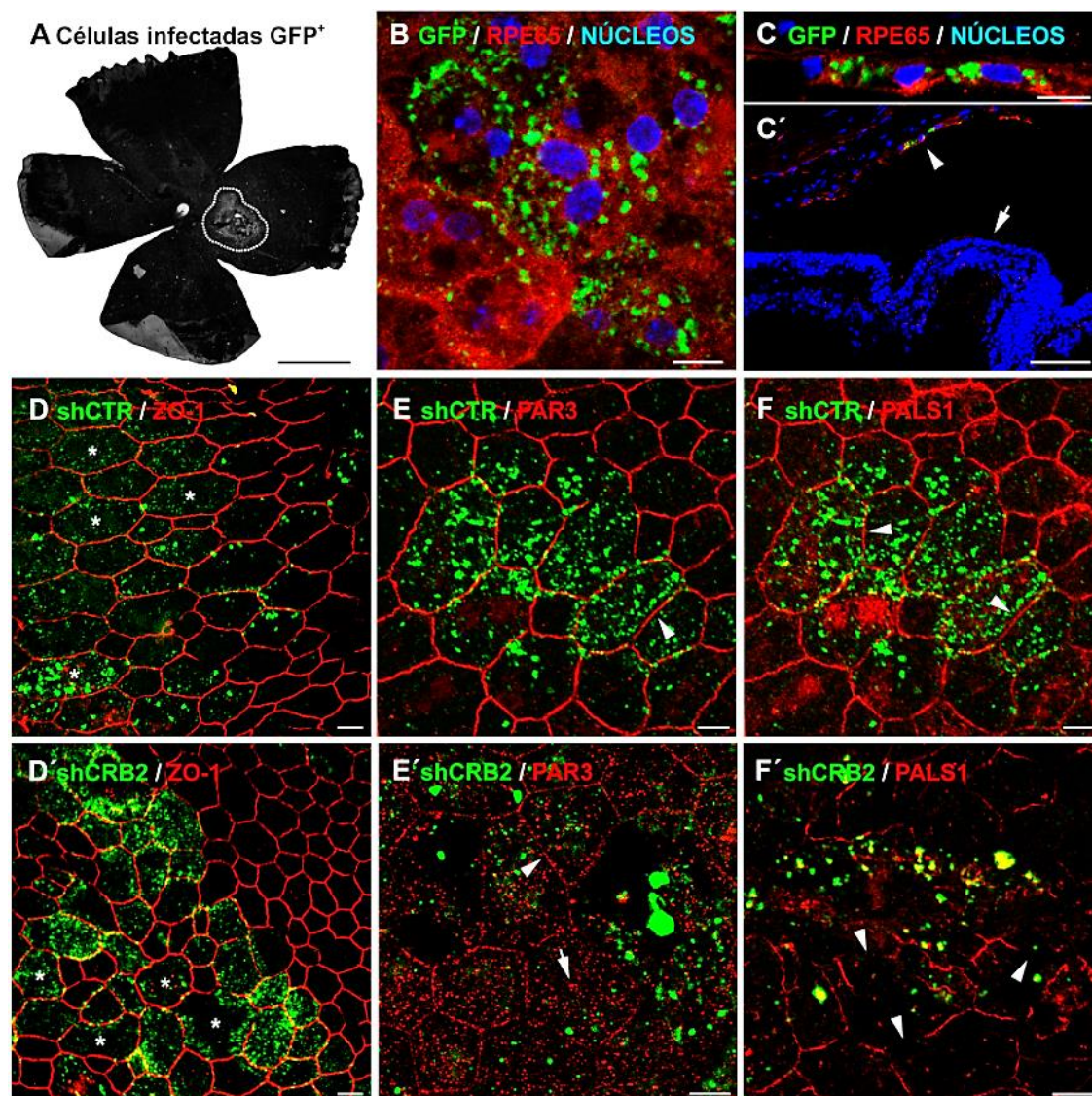


Figura 13- Caracterización del método de infección de las células de epitelio pigmentario y análisis de los efectos del silenciamiento de CRB2 en las mismas. (A) Imagen representativa de un *Flat Mount* de epitelio pigmentario mostrando, mediante microscopía de epifluorescencia, el área que ocupan las células infectadas con vectores lentivirales que expresan la proteína GFP (punteado blanco). (B) Imagen de microscopía láser confocal del marcaje por inmunofluorescencia de la proteína RPE65 en *Flat Mount* de epitelio pigmentario, mostrando que las células infectadas (en verde) son células de epitelio pigmentario. (C, C') Imágenes de microscopía láser confocal del marcaje por inmunofluorescencia de RPE65 en criosecciones de retina mostrando que los vectores lentivirales infectan de forma exclusiva las células de epitelio pigmentario (Cabeza de flecha en C'), pero no ningún otro tipo celular de la retina (Flecha en C'). (D) Imagen de microscopía láser confocal del marcaje por inmunofluorescencia de la proteína ZO-1, mostrando que esta proteína se localiza en la membrana plasmática de las células infectadas con el shCTR, que presentan la típica morfología epitelial poliédrica (Asteriscos en D). (D') Las células infectadas con el shCRB2, aunque mantienen la localización de ZO-1 en la membrana plasmática, sufren cambios morfológicos severos como la deformación curva de la membrana plasmática (Asteriscos en D'). (E) Imagen de microscopía láser confocal del marcaje por inmunofluorescencia de la proteína PAR3, mostrando su localización continua en la membrana plasmática de las células infectadas con el shCTR (Cabeza de flecha en E). (E') En las células infectadas con el shCRB2, sin embargo, PAR3 presenta una distribución parcheada en la membrana plasmática (Cabeza de flecha en E') y también en el citoplasma (Flecha en E'). (F) Imagen de microscopía láser confocal del marcaje por inmunofluorescencia de la proteína PALS1 mostrando que, en células infectadas con el shCTR, PALS1 se extiende a lo largo de toda la membrana plasmática (Cabezas de flecha en F). (F') Sin embargo, en células infectadas con el shCRB2, PALS1 desaparece de algunas zonas de la membrana plasmática (Cabezas de flecha en F'). Barra de escala en (A): 1 mm; (B-C; D-F): 10 μ m; (C'): 50 μ m

infectadas con el shCTR mantienen la forma típica epitelial poliédrica (**Asteriscos en Figura 13D**), las que tienen CRB2 silenciado tienen muchas de sus caras curvas (**Asteriscos en Figura 13D'**). A continuación analizamos el estado de los complejos de polaridad apical mediante el marcaje por inmunofluorescencia de PAR3, y observamos que en las células infectadas con shCTR (**Figura 13E**), PAR3 se distribuye de forma continua por la membrana plasmática (**Cabeza de flecha en Figura 13E**), mientras que en las células infectadas con el shCRB2 (**Figura 13E'**), PAR3 tiene una localización discontinua y punteada en la membrana plasmática (**Cabeza de flecha en Figura 13E'**), así como en el citoplasma (**Flecha en Figura 13E'**). Por último, el marcaje mediante inmunofluorescencia de PALS1 muestra que en células infectadas con el shCTR (**Figura 13F**) PALS1 se distribuye a lo largo de toda la membrana plasmática (**Cabezas de flecha en Figura 13F**), mientras que en las células infectadas con el shCRB2 (**Figura 13F'**) no se localiza en muchas zonas de la membrana plasmática (**Cabezas de flecha en Figura 13F'**).

Por lo tanto, el silenciamiento de CRB2 produce cambios en la morfología de las células de epitelio pigmentario así como la desorganización parcial de los complejos de polaridad apical Par y Crb.

3.3 Análisis de los efectos del silenciamiento de CRB2 en la homeostasis de la retina

Puesto que el silenciamiento de CRB2 en las células de epitelio pigmentario produce alteraciones en este tipo celular, en primer lugar quisimos saber si éstas tienen efectos en el mantenimiento de la homeostasis de la zona escleral de la retina. Para ello analizamos y comparamos las poblaciones de células microgliales presentes en el espacio subretinal de animales inyectados con el shCTR y con el shCRB2, ya que su presencia y tipo son un indicador directamente relacionado con la alteración y el grado de daño de esta zona¹⁷². Realizamos un marcaje inmunofluorescente para la proteína específica de células de microglía Iba1 en *Flat Mounts* de epitelio pigmentario (**Figura 14A**), y diferenciamos la población de microglía no fagocítica por su morfología ramificada (**Flechas en Figura 14A**), y de la fagocítica por su morfología ameboide (**Cabezas de flecha en Figura 14A**). El recuento de estas células indica que existe un mayor número de células microgliales totales en los ojos inyectados con el shCRB2 ($\bar{X}=761,17 \pm 54,07$; $n=6$) (**Figura 14B,D**) en comparación con los que han sido inyectados con el shCTR ($\bar{X}=343,17 \pm 105,78$; $n=6$) ($p=0,003$; $n=12$) (**Figura 14B,C**). Sin embargo, cuando diferenciamos entre los tipos morfológicos de las células microgliales observamos que no existen diferencias significativas

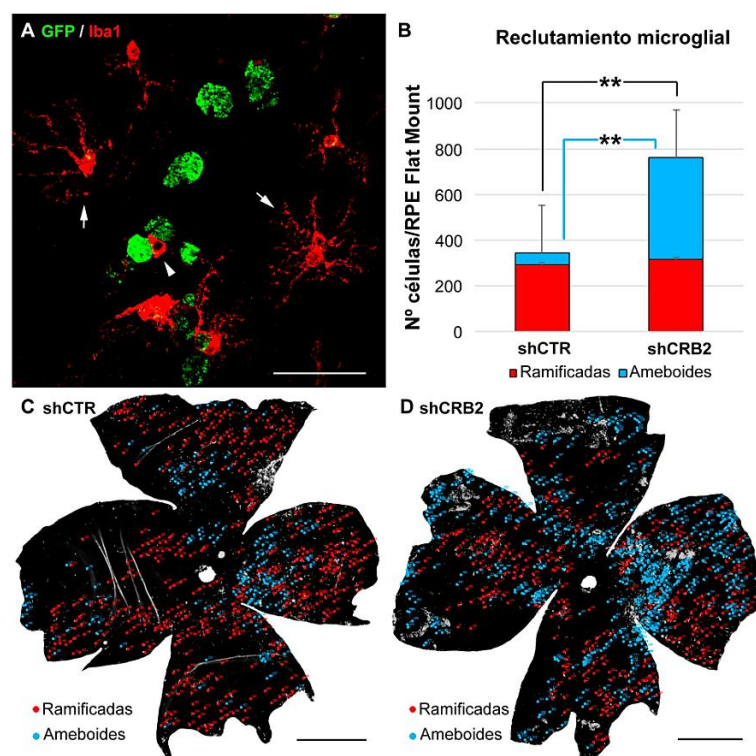


Figura 14- Análisis del efecto del silenciamiento de CRB2 en el espacio subretinal. (A) Imagen de microscopía láser confocal del marcaje por inmunofluorescencia de la proteína Iba1 mostrando las poblaciones de células de microglía de morfología ramificada (flechas) y ameboides (cabeza de flecha) junto con las células infectadas de epitelio pigmentario que expresan GFP (en verde). (B) Recuento y comparación de células microgliales presentes en el espacio subretinal de los ojos inyectados con el shCTR o con el shCRB2, mostrando que existen diferencias altamente significativas en el número de células microgliales totales (rojo más azul) y ameboides (azul), que son más abundantes al silenciar CRB2 en el epitelio pigmentario. Sin embargo, el número de células microgliales ramificadas (rojo) es similar en ambos casos. (C, D) Imágenes representativas de *Flat Mounts* de epitelio pigmentario mostrando la distribución y recuento de células de microglía con morfología ramificada (rojo) y ameboides (azul) presentes en el espacio subretinal en un ojo inyectado con el shCTR y con el shCRB2. Barra de escala en (A): 50 μ m; (C,D): 1 mm. Barras de error en (B): error estándar de la media. ** en (B): p valor < 0,01

en el número de células microgliales ramificadas entre los ojos inyectados con el shCTR (\bar{x} =293,83 \pm 94,46; n=6), y los inyectados con el shCRB2 (\bar{x} =314,50 \pm 56,42; n=6) (p=0,855; n=12) (Figura 14B-D), pero sí en el número de células microgliales ameboides que es significativamente mayor en los ojos inyectados con el shCRB2 (\bar{x} =446,67 \pm 146,36; n=6) respecto a los del shCTR (\bar{x} =49,33 \pm 33,66; n=6) (p=0,006; n=12) (Figura 14B-D). La distribución de las células de ambos tipos se extiende a lo largo de todo el espacio subretinal en los dos grupos experimentales, aunque existe una concentración ligeramente mayor,

especialmente de las células de fenotipo ameboides, en la zona de inyección (Figura 14C,D). Por lo tanto, el silenciamiento de CRB2 produce la llegada y activación de células microgliales al espacio subretinal.

En vista de estos resultados, nos propusimos averiguar si el silenciamiento de CRB2 en las células de epitelio pigmentario tiene algún efecto en la homeostasis de la retina neural. Para ello analizamos el estado de una serie de proteínas que sufren alteraciones cuando se produce un daño en la retina, como es la sobreexpresión de GFAP por parte de las células de Müller²⁰², o la desorganización de los segmentos externos de los fotorreceptores y de sus

sinapsis¹⁹⁴. En primer lugar comparamos los niveles de expresión de estas proteínas mediante Western blot, pero no detectamos diferencias entre los ojos inyectados con el shCTR y los del shCRB2 (**Figura 15**). A continuación analizamos la distribución de estas proteínas en la retina neural mediante inmunofluorescencia en crio secciones de retina adyacentes a la zona de inyección, donde la retina no ha sido dañada directamente durante el procedimiento. Observamos que las retinas de ambos grupos experimentales mantienen la laminación característica (**Figura 16A-D**).



Figura 15- Análisis del efecto del silenciamiento de CRB2 en los niveles de expresión de indicadores del estado de la homeostasis de la retina neural. Análisis mediante Western blot de los niveles de expresión de GFAP, Rodopsina y Sinaptotagmina en ojos inyectados con el shCTR y el shCRB2 mostrando que no existen diferencias en ninguna de las proteínas entre los dos grupos experimentales. β-actina empleada como control de carga.

Además, tanto en los ojos inyectados con el shCTR (**Figura 16A**) como con el shCRB2 (**Figura 16A'**), la proteína GFAP se encuentra principalmente expresada en las células de Müller a nivel de la membrana limitante interna, y en procesos de éstas en las capas internas de la retina (**Cabezas de flecha en Figura 16A, A'**). A continuación estudiamos el estado de los fotorreceptores con el marcador específico de conos PNA, y observamos que tanto en los ojos inyectados con el shCTR (**Figura 16B**) como con el shCRB2 (**Figura 16B'**) no existen alteraciones ni el segmento externo (**Cabezas de flecha en Figura 16B, B'**) ni en los terminales sinápticos de los conos (**Flechas en Figura 16B, B'**). Por último analizamos el estado de las capas plexiformes con el marcaje de la proteína Bassoon, no apreciándose diferencias evidentes en las sinapsis de los ojos inyectados con el shCTR (**Figura 16C**) respecto al shCRB2 (**Figura 16C'**), ni en la capa plexiforme externa (**Cabezas de flecha en Figura 16C, C'**) ni en la capa plexiforme interna (**Flechas en Figura 16C, C'**). Por lo tanto, aunque existe una reacción glial en ambos casos que, probablemente, se deba al método utilizado para liberar los vectores lentivirales en el espacio subretinal, no existen diferencias en el estado de la retina neural entre los ojos inyectados con el shCTR y los que han sido inyectados con el shCRB2.

Podemos concluir respecto al cuarto y último objetivo que, a los 60 días del silenciamiento de CRB2 en las células del epitelio pigmentario *in vivo* aparecen alteraciones en estas células que originan una activación microglial en el espacio subretinal, lo que indica

Resultados

que existe un daño en el epitelio pigmentario, pero que no parece afectar aún a la homeostasis de la retina neural.

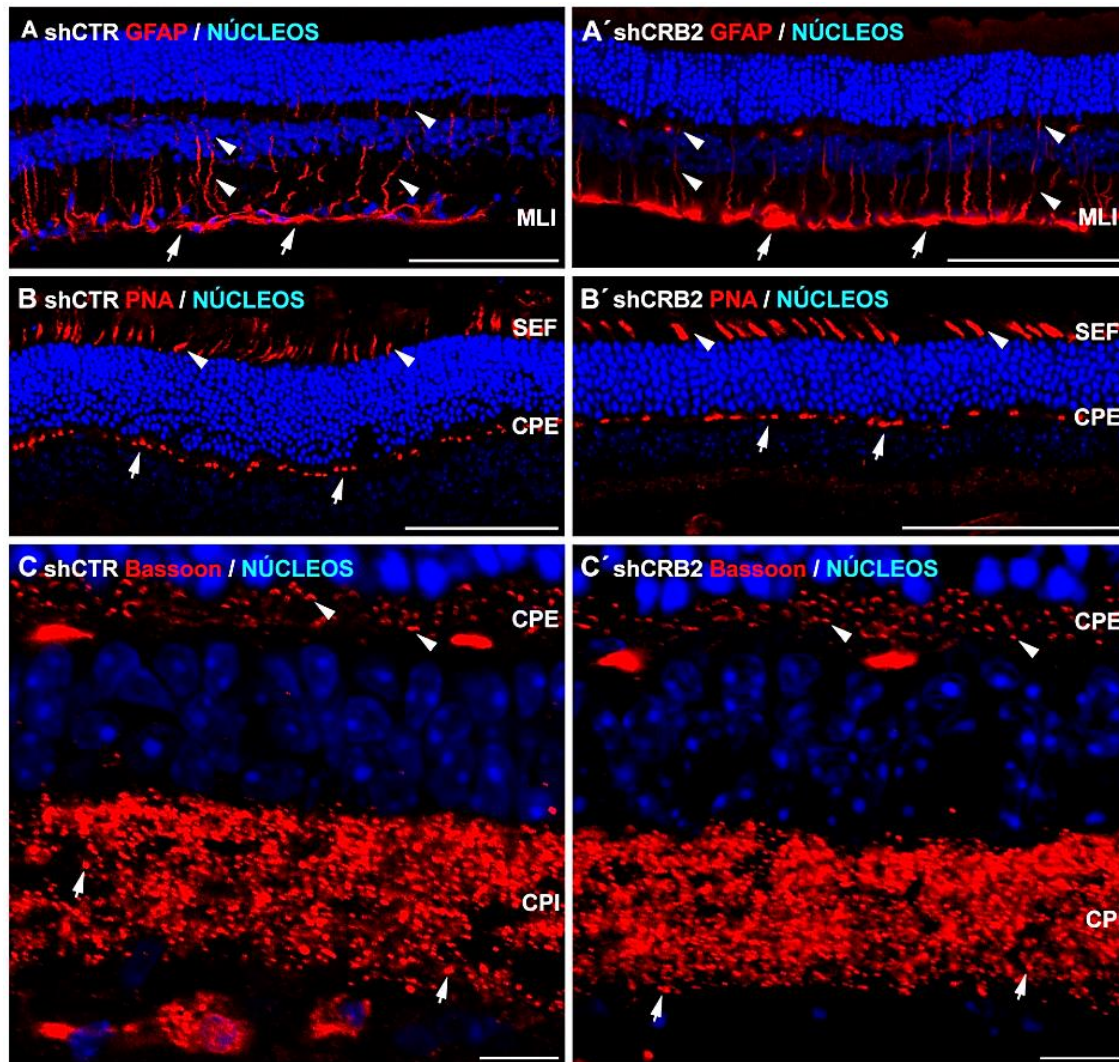


Figura 16- Análisis del efecto del silenciamiento de CRB2 en la localización de indicadores del estado de la homeostasis de la retina neural. (A,A') Imagen de microscopía láser confocal del marcaje mediante inmunofluorescencia de la proteína GFAP mostrando que se localiza de forma similar, a nivel de la membrana limitante interna (Flechas en A, A') y en procesos celulares más internos (Cabezas de flecha en A, A'), en los ojos inyectados con el shCTR y en los inyectados con el shCRB2. **(B,B')** Tampoco existen diferencias en el segmento externo de los conos (Cabezas de flecha en B, B') ni en sus terminales sinápticos (Flechas en B, B'), marcados con PNA, entre los ojos inyectados con el shCTR y el shCRB2. **(C,C')** No existen diferencias en el estado de las sinapsis, valorada por el marcaje de Bassoon, entre los ojos inyectados con el shCTR y el shCRB2 ni en la capa plexiforme externa (Cabezas de flecha en C, C') ni en la capa plexiforme interna (Flechas en C, C'). Barra de escala en (A-B): 100 μ m; (C, C'): 10 μ m. MLI: Membrana limitante interna. SEF: Segmentos externos de los fotorreceptores. CPE: Capa plexiforme externa. CPI: Capa plexiforme interna

Discusión

El complejo Crb es un complejo proteico que determina la zona apical en las células polarizadas. Tiene un papel fundamental en la formación de tejidos durante el desarrollo embrionario y juega un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos maduros¹¹⁰. En mamíferos, está compuesto por las proteínas PALS1, PATJ y alguna de las isoformas CRB: CRB1, CRB2 o CRB3. Las proteínas CRB tienen una expresión dependiente de tejido, de modo que el complejo Crb se completa de manera diferente en cada tipo celular⁵⁶. CRB3 es la isoforma más estudiada hasta el momento, y se expresa en números tejidos epiteliales⁹⁴. La expresión de CRB1, por el contrario, está restringida al tejido nervioso, mientras que CRB2 se ha detectado en diferentes órganos como el riñón, la retina y el cerebro¹³⁰. Mutaciones o alteraciones en los niveles de expresión de las proteínas del complejo Crb son causantes de diversas patologías en humanos, entre las que destacan las que afectan a CRB3, que provocan la aparición de tumores¹⁵¹; aquellas que afectan a CRB2 y que producen malformaciones durante el desarrollo¹³⁹; y las mutaciones de CRB1, que dan origen a enfermedades degenerativas de la retina^{113, 137}.

En la retina neural de mamíferos se expresan las tres isoformas CRB, principalmente en las células de Müller y los fotorreceptores, junto con el resto de componentes del complejo²⁰³. En el epitelio pigmentario, aunque se ha detectado la expresión de las proteínas PALS1¹⁵⁷ y PATJ¹⁸⁴, aún no se había descrito la expresión de ninguna de las isoformas CRB. Sin embargo, sí se había detectado la expresión del mRNA de *Crb2*¹³⁰, por lo que la proteína CRB2 era una firme candidata para completar el complejo Crb en este tejido.

Debido a la importancia que tiene el complejo Crb en las células polarizadas, y al desconocimiento de la expresión de alguna isoforma de la familia de proteínas CRB en el epitelio pigmentario, en el presente trabajo hemos descrito por primera vez la expresión de CRB2 en este tejido, así como su función durante el proceso de polarización apicobasal de estas células epiteliales y una vez terminado el mismo.

1. La expresión de CRB2 en el epitelio pigmentario

1.1 La expresión dependiente de tejido de las isoformas Crb

En el presente trabajo hemos detectado la expresión del mRNA *Crb2* en el epitelio pigmentario del ratón adulto, descartando al mismo tiempo LAde *Crb1*, y reafirmando así los resultados de un trabajo previo¹³⁰. Además, hemos descrito la expresión del mRNA *Crb3* en este tipo celular, algo que no se había observado hasta la fecha. Estos datos resaltan la expresión dependiente de tejido de cada una de las tres isoformas, y refuerzan la importancia que tienen *Crb2* y *Crb3* en tejidos epiteliales, ya que describimos la expresión de estos mRNA en otro tejido epitelial donde se desconocía hasta ahora, mientras que restringe la presencia de *Crb1* al tejido nervioso.

1.2 La detección de CRB2 en el epitelio pigmentario

Existen numerosos estudios donde se ha analizado la localización y función de CRB2 y CRB3 en el conjunto de la retina, pero en ninguno de ellos se ha podido demostrar la expresión de alguna estas proteínas en el epitelio pigmentario^{141, 142, 185, 190, 203}. Los anticuerpos utilizados para detectar CRB2, en su mayor parte dirigidos contra la región extracelular de la proteína, no la localizan en el epitelio pigmentario^{125, 142, 184}. Una de las razones que pueden explicar este hecho es que los anticuerpos y métodos utilizados en estos trabajos no eran los apropiados para su detección en este tejido. Puesto que estos anticuerpos no están disponibles comercialmente, y los escasos que sí lo están no proporcionaron resultados satisfactorios en la detección de la proteína en este tejido, decidimos generar y caracterizar un nuevo anticuerpo dirigido contra la región intracelular que asegurara la inmunodetección de CRB2 en cualquier tipo celular. Hemos comprobado la especificidad del anticuerpo en diferentes líneas celulares mediante el análisis por Western blot de la sobreexpresión y silenciamiento de CRB2, lo que nos ha permitido confirmar la expresión de esta proteína en el epitelio pigmentario, así como en las células ChrPE, y en retina y cerebro de ratón, donde ya había sido detectada previamente^{141, 155, 184}.

En todos estos tipos celulares, CRB2 tiene un peso molecular de aproximadamente 150 kDa, muy cercano al peso molecular estimado, que es de 134 kDa¹⁹⁹. Además, en los distintos tejidos de ratón analizados detectamos una banda adicional a 260 kDa que las diferentes técnicas empleadas no nos han permitido confirmar si efectivamente corresponde a la misma proteína. De hecho, en la literatura encontramos resultados muy diversos en cuanto al peso molecular detectado de CRB2, habiendo sido descrito desde los 100 a los 220 kDa en

diferentes modelos, como la línea celular CGR 8.8 de ratón¹⁴⁰, cerebro embrionario de ratón¹⁵⁵, cerebro de *Macaca fascicularis*¹²⁵ y en las líneas celulares de origen humano HEK293 y SH-SY5^{125, 204}. Puesto que los ortólogos de CRB2 de estas especies son muy similares entre sí, las diferencias en el peso molecular podrían deberse a modificaciones postraduccionales de la proteína, a procesos de *splicing* alternativo del mRNA dependientes del tejido o del contexto experimental, o bien a ambos. Este tipo de modificaciones ya se han detectado en CRB3, que es susceptible de sufrir distintos tipos de glicosilación^{116, 205}, o en CRB1, que puede sufrir un *splicing* alternativo dependiente de tejido que da origen a una proteína secretable de menor tamaño^{117, 187}. Este mismo proceso se ha observado para el mRNA de CRB2¹¹⁵, aunque por ahora no se ha identificado ningún producto transcrito de estas características, siendo necesarios nuevos experimentos que confirmen esta hipótesis.

Además, hemos descartado la reacción cruzada del anticuerpo con CRB3, lo que indica que la región seleccionada para generar el anticuerpo dirigido contra CRB2, a pesar de compartir un 50 % de aminoácidos entre ambas proteínas, es suficientemente diferente como para distinguir exclusivamente la secuencia de CRB2. Sin embargo, aunque la secuencia seleccionada para generar el anticuerpo muestra el mismo grado de similitud con la de CRB1 (50 %), no descartamos que el anticuerpo reconozca también esta isoforma, pero, puesto que CRB1 no se expresa en el epitelio pigmentario, la reacción cruzada nunca se podría dar en este tejido.

Por lo tanto, dada la alta especificidad del anticuerpo, demostrada por diferentes métodos, creemos que la banda proteica de mayor peso molecular puede corresponder a CRB2 tras sufrir modificaciones postraduccionales tales como glicosilaciones, o a la formación de agregados proteicos, procesos que se ha demostrado le ocurren a la proteína CRB2 humana¹²⁵.

1.3 La localización de CRB2 en el epitelio pigmentario

Los análisis realizados mediante inmunofluorescencia en *Flat Mounts* de epitelio pigmentario indican que CRB2 se localiza en las uniones ocluyentes, junto a PALS1, otra proteína del complejo Crb, de la misma forma que lo hace el conjunto de proteínas del complejo en otras células epiteliales^{52, 145}. Destacamos que CRB2 sólo pudo ser detectada mediante el empleo de *Flat Mounts* de epitelio pigmentario, y no mediante crio secciones de retina y epitelio pigmentario, de forma similar a lo descrito para PALS1 en otros trabajos^{157, 206}, y que también podría explicar por qué no se había detectado CRB2 previamente en este tipo celular, pero sí en fotorreceptores y células de Müller^{141, 142, 184, 203}. Cabe señalar que CRB2

y PALS1 no colocalizan completamente en la membrana apicolateral, ya que PALS1 muestra una distribución continua a lo largo de esta, mientras que CRB2 lo hace de manera parcheada. Esto abre la posibilidad a que PALS1 no se encuentre siempre unida a CRB2 en estas células, y que pueda hacerlo también a CRB3, cuyo mRNA hemos demostrado que se encuentra expresado en el epitelio pigmentario. La coexpresión de CRB2 y CRB3 se ha detectado en células de Müller y fotorreceptores^{142, 185, 203}, y, aunque ambas intervienen en la dotación de polaridad apicobasal y en la estabilización de las uniones ocluyentes, CRB2 posee un gran dominio extracelular del cual carece CRB3¹¹⁶, y cuya función es aún controvertida, por lo que ambas podrían tener papeles complementarios en el tejido.

Además de en la membrana apicolateral, CRB2 muestra también una distribución punteada en el citoplasma. Al igual que ocurre con numerosas proteínas de las uniones celulares, el control del tráfico de las proteínas CRB desde su síntesis en el aparato de Golgi hasta alcanzar la membrana apical y viceversa, es esencial para la regulación de la función del complejo en célula^{205, 207, 208}. Por ello, creemos probable que el marcaje punteado de CRB2 en el citoplasma corresponda a la proteína que está siendo transportada entre estas dos localizaciones, aunque son necesarios experimentos que confirmen esta hipótesis.

Para marcar CRB2 en las células ChrPE en cultivo hemos empleado un nuevo anticuerpo comercial que no estaba disponible inicialmente, que ha proporcionado resultados satisfactorios en estas condiciones, confirmando así la expresión de CRB2 en este tipo celular mediante la utilización de una herramienta diferente.

Por lo tanto, todos estos resultados demuestran por primera vez que CRB2, con un peso de 150 kDa, se expresa en el epitelio pigmentario maduro, donde se localiza en las uniones ocluyentes. Hasta ahora, este tejido resultaba ser una excepción donde el complejo Crb no se expresaba al completo, pero estos resultados no solo demuestran que CRB2 forma parte del complejo Crb en este tejido sino que también abren la puerta a la expresión de CRB3.

2. Las células ChrPE: Un nuevo modelo para el estudio *in vitro* del epitelio pigmentario

En vista de estos resultados, y teniendo en cuenta la importancia que tiene una adecuada polarización apicobasal de las células de epitelio pigmentario para el mantenimiento de la homeostasis del conjunto de la retina^{157, 209}, decidimos estudiar el papel de CRB2 en este tipo celular. Para ello hemos analizado su función mediante el silenciamiento de la proteína

durante la adquisición de polaridad apicobasal de células de epitelio pigmentario humano en cultivo, y una vez ya establecida, en células de epitelio pigmentario de ratones adultos *in vivo*.

2.1 Modelos de cultivo para el estudio de la polaridad apicobasal y del epitelio pigmentario

Gran parte de los estudios publicados sobre la función de las proteínas de los complejos de polaridad han sido realizados en las líneas celulares inmortalizadas MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), que derivan de epitelio renal canino, y Caco2, derivadas de adenocarcinoma de colon humano^{94, 114, 158, 207, 210}. Estas dos líneas celulares son capaces de formar monocapas que presentan uniones ocluyentes y un alto grado de polaridad apicobasal^{110, 211, 212}, pero al no provenir de epitelio pigmentario no cumplen con uno de los requisitos necesarios para ser objeto de nuestro estudio.

Sin embargo, sí existe un gran número de líneas celulares inmortalizadas derivadas de epitelio pigmentario, entre las que destaca la línea celular de origen humano ARPE-19, donde actualmente se realizan gran parte de los estudios *in vitro* sobre la biología de estas células²¹³. Esta línea celular puede llegar a mostrar cierto grado de polarización apicobasal bajo determinadas condiciones de cultivo, pero no alcanza niveles de polarización y diferenciación similares a los de un epitelio pigmentario *in vivo*^{214, 215}. Los mejores resultados en cuanto a la semejanza al fenotipo epitelial se han conseguido con cultivos primarios de células fetales de epitelio pigmentario humano, además de con células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas, diferenciadas a epitelio pigmentario, que son las que presentan características más parecidas a las encontradas en el epitelio pigmentario *in vivo*, aunque su disponibilidad es más limitada que en el caso de las líneas celulares inmortalizadas, ya que mueren tras un número limitado de pases^{215, 216}. Por último, son también habituales los cultivos primarios de células de epitelio pigmentario de distintos animales, entre los que se encuentra el ratón, el pollo, la vaca o el cerdo, donde se han analizado distintos aspectos de la biología de este tipo celular, y cuya disponibilidad es mayor que en el caso de las células de origen humano, pero en los que no se ha alcanzado una significativa polarización apicobasal²¹⁵.

Otro factor fundamental para el desarrollo del fenotipo epitelial, además del origen de las células, son las condiciones de cultivo, y en concreto el sustrato y el medio de cultivo. El medio de cultivo más utilizado es el DMEM/F12, suplementado con una variedad de factores de crecimiento dependiendo del estudio, y en el que se regula también la cantidad de suero fetal bovino que contiene el medio²¹⁵. En cuanto a los sustratos utilizados, estos

varían desde placas de cultivo sin ningún tratamiento especial a estar recubiertas de materiales como colágeno, laminina o matrigel, que favorecen la adhesión y el desarrollo de las células epiteliales²¹⁵. Sin embargo, existe consenso en que los mayores niveles de polarización y diferenciación epitelial de las células se consiguen cuando son cultivadas en cestas Transwell®, que les permiten diferenciar una zona apical de una basal²¹⁷.

2.2 El fenotipo epitelial de las células ChRPE en cultivo

Inicialmente, realizamos pruebas de inmunofluorescencia para CRB2 tanto en la línea celular ARPE-19 como en cultivos primarios de células de epitelio pigmentario de ratón siguiendo diferentes protocolos de cultivo^{217, 218}, pero en todos los detectamos que, aunque expresada, la proteína permanece en el aparato de Golgi sin llegar a localizarse en la membrana plasmática (resultados no mostrados). Posteriormente comprobamos que esta observación también ocurre en la línea celular de origen murino mIMCD-3 (ATTTC®), derivada de células de la médula renal (resultados no mostrados), por lo que parece que es un comportamiento común de CRB2 en varios tipos celulares epiteliales, caracterizados por mostrar un bajo desarrollo de la polaridad apicobasal.

La falta de un modelo válido para la realización del estudio sobre el papel de CRB2 durante el proceso de polarización, nos llevó a emplear un nuevo modelo de células de epitelio pigmentario humano en cultivo adquiridas a la casa comercial LONZA, las células Clonetics™ Human RPE (ChRPE). Tras seguir el protocolo de cultivo indicado en la sección **“Materiales y Métodos”** de la presente tesis doctoral, hemos observado que las células proliferan hasta formar una monocapa de una determinada densidad celular, momento en el cual comienza un proceso de diferenciación, que conlleva la inhibición del ciclo celular, ralentizando paulatinamente la tasa de proliferación. Esto va acompañado por un proceso de polarización apicobasal, en el que las células adquieren morfología poliédrica mediante el desarrollo del cinturón de Actina; se forman estructuras celulares como las microvellosidades en la zona apical y el laberinto basal; se polarizan orgánulos como las mitocondrias y el núcleo, que se sitúan en la zona basal; y se forman uniones celulares en la membrana apicolateral. Además, el cultivo muestra un comportamiento fisiológico típico de los epitelios, como es el cierre progresivo al paso de iones a través del espacio paracelular. Finalmente, tras 21 días en cultivo, las células presentan la proteína CRB2 localizada en la membrana plasmática, al igual que observamos que ocurre en las células de epitelio pigmentario maduro *in vivo*.

Por lo tanto, el modelo de cultivo de células ChRPE empleado y puesto a punto en este trabajo, presenta características propias de un epitelio con un alto grado de diferenciación y polaridad apicobasal²¹⁵, y es válido para realizar el análisis de la función de CRB2 en este tipo celular.

Además presenta una serie de ventajas para el estudio de la biología general de las células epiteliales respecto a modelos similares puesto que:

- 1- Las células son de fácil adquisición, ya que están disponibles comercialmente.
- 2- Son de fácil cultivo, puesto que sólo requiere la siembra de las células en cestas Transwell® y el uso de un único medio de cultivo también disponible comercialmente.
- 3- Desarrollan un alto grado de polarización apicobasal y de diferenciación comparable al observado en las células *in vivo*.
- 4- Son de origen humano, lo que les proporciona un valor añadido como modelo para el estudio de enfermedades que afectan a este tejido en nuestra especie.

Por el contrario, tiene algunas desventajas como que:

- 1- Las características epiteliales de las células dejan de estar presentes tras numerosos pases, por lo que el número disponible de células no es ilimitado.
- 2- La composición del medio de cultivo se desconoce, ya que está preservado bajo secreto comercial.
- 3- El tiempo que tardan en adquirir un alto grado de polaridad es relativamente lento, 21 días en cultivo, al compararlo con otros modelos que suelen necesitar aproximadamente una semana¹⁵⁸; aunque este hecho ha sido clave para el estudio del proceso de polarización apicobasal, ya que nos ha permitido diferenciar y analizar cada una de las etapas del proceso con mayor facilidad.

3. El patrón de expresión y localización de las proteínas de polaridad apical durante el proceso de polarización epitelial

3.1 La formación de las uniones celulares durante el proceso de polarización

La caracterización del desarrollo morfofisiológico del cultivo nos ha permitido observar que existe una coordinación temporal entre la formación de las uniones celulares y la de los

complejos Par y Crb durante el proceso de polarización apicobasal. El establecimiento de las uniones celulares en nuestro modelo sigue el orden generalmente descrito en otros epitelios⁸, en el que primero se forman las uniones adherentes, donde detectamos las proteínas β -catenina y ZO-1, cuando las células no muestran aún apenas signos de polarización apicobasal y una gran parte se encuentra en proliferación; y después las uniones ocluyentes, donde se localiza la proteína Ocludina, a la vez que las células comienzan a desarrollar características polarizadas y a diferenciarse. El hecho de que ZO-1 se localice en las uniones adherentes de forma previa a la formación de las uniones ocluyentes²⁷, no suele tenerse en cuenta en un gran número de estudios sobre la polarización de las células epiteliales, que utilizan la presencia de esta proteína en la membrana plasmática como marcador de uniones ocluyentes²¹⁹ y, por lo tanto, de polarización y diferenciación. Sin embargo, como hemos observado, ZO-1 se localiza en la membrana plasmática no solo en ausencia de uniones celulares ocluyentes, sino que también durante un momento en el que las células presentan un bajo grado de diferenciación y polarización apicobasal, por lo que su utilización como marcador de las uniones ocluyentes debería ir acompañado de otro tipo de pruebas que así lo certifiquen.

3.2 La formación del complejo Par durante el proceso de polarización

La formación de las uniones adherentes y ocluyentes coincide temporalmente con el establecimiento en la membrana plasmática de los complejos Par y Crb respectivamente, aunque cada uno presenta determinados matices en su formación.

Las proteínas del complejo Par: PAR3 y aPKC, se expresan y localizan en la membrana plasmática desde un momento temprano del proceso de polarización, como ya había sido descrito en otros epitelios, cuando las uniones adherentes se encuentran formadas, pero no así las ocluyentes, y las células muestran aún un bajo grado de polaridad apicobasal^{220, 221, 222, 223, 224}. Ambas proteínas se mantienen en la membrana plasmática durante todo el proceso, si bien su distribución se define conforme la célula desarrolla la morfología epitelial.

Por lo tanto, las uniones adherentes y el complejo Par están presentes en la membrana plasmática durante todo el proceso de polarización epitelial, también cuando las células muestran un bajo grado de diferenciación y polarización apicobasal, por lo que su utilización como marcadores de madurez de la célula epitelial debería ir acompañada siempre de análisis complementarios que así lo determinen.

3.3 La formación del complejo Crb durante el proceso de polarización

La llegada de las proteínas del complejo Crb: PATJ, PALS1 y CRB2, a la membrana plasmática transcurre junto con la formación de las uniones ocluyentes, durante un estado intermedio de la polarización apicobasal; sin embargo, cada una de ellas muestra un comportamiento particular en este proceso.

PATJ es la primera proteína del complejo Crb en expresarse, y lo hace de manera previa a la formación de este tipo de uniones. En ese momento, PATJ presenta una localización citoplasmática, con una distribución peculiar, en forma de ovillos de aspecto filamentoso, que recuerda a elementos del citoesqueleto. La reorganización del citoesqueleto durante el proceso de polarización apicobasal ha sido extensamente estudiada^{8, 41}, pero, por el momento, la única proteína de la cual se ha descrito la capacidad de coordinar la actividad de los complejos de polaridad y cambios en el citoesqueleto es aPKC, aunque el modo en el que lo realiza aún se desconoce⁹⁹. Esta proteína es activada por las GTPasas pequeñas Cdc42 y Rac1, cuya implicación en este tipo de eventos es muy conocida¹⁰⁴, y se localiza en zonas donde se produce un reordenamiento del citoesqueleto gracias, al menos en parte, a PATJ²²⁵, que, a su vez, es capaz de formar un complejo con la proteína activadora de Cdc42, Rich1²²⁶. Por lo tanto, existen numerosos datos que sugieren que PATJ podría ser el elemento que pusiera en contacto a estos actores, aunque son necesarios estudios específicos que confirmen esta hipótesis.

A continuación, coincide temporalmente la aparición de las uniones ocluyentes con el comienzo de la expresión de CRB2 y PALS1, y la localización de esta última junto a PATJ en la membrana plasmática, aunque no de CRB2, que permanece en el citoplasma. La relación directa entre la formación de las uniones ocluyentes y la del complejo Crb ha sido muy estudiada en diversos tipos celulares^{93, 94, 123, 158, 160}, sin embargo, aún no podemos afirmar cuál de los dos procesos ocurre en primer lugar o si lo hacen simultáneamente, por lo que son necesarios estudios más exhaustivos de este proceso que respondan a esta pregunta. También se desconoce si la formación del complejo Crb ocurre con la llegada simultánea a la membrana plasmática de los distintos miembros, o es alguno de ellos específicamente el que inicia el proceso. Nosotros hemos comprobado que en las células ChrPE, CRB2 se encuentra expresada en este momento, pero su localización es principalmente citoplasmática, por lo que quedaría descartada para iniciar el proceso de formación del complejo en la membrana plasmática. Desafortunadamente, no disponemos datos sobre la expresión ni localización de CRB3 debido a la falta de herramientas para su estudio, por lo

que no podemos confirmar o descartar su presencia en la membrana plasmática en este momento. La sobreexpresión de CRB3 ha sido relacionada con la formación de uniones ocluyentes en la línea celular MCF10A que normalmente carece de ellas^{123, 227}, implicándola directamente con el inicio de la formación de las mismas. Sin embargo, también se ha observado que las proteínas PALS1 y PATJ se localizan en la membrana plasmática mientras CRB3 muestra una localización citoplasmática durante procesos de migración celular^{225, 228}, lo que relaciona de nuevo a las primeras con procesos de reorganización del citoesqueleto, y que demuestra que PALS1 y PATJ pueden formar parte del complejo sin la necesidad de CRB3. Entre las proteínas PALS1 y PATJ existe una relación interdependiente muy fuerte, mayor que con las proteínas CRB, tanto en su expresión como en la localización en la membrana plasmática^{158, 210}, lo que hace muy complicado el estudio independiente de la función de ambas. Teniendo además en cuenta que los niveles de expresión de PATJ se estabilizan con la presencia de PALS1¹⁵², creemos probable que la expresión y localización en la membrana plasmática de PALS1 sea también la responsable de estabilizar la localización de PATJ en ella, pero falta determinar si PALS1 es la que inicia este proceso o bien si llega a la membrana plasmática con la ayuda de otra proteína como CRB3.

Finalmente detectamos la llegada de CRB2 a la membrana plasmática, siendo esta la última proteína estudiada en llegar a formar parte del complejo Crb y de las uniones celulares. Como hemos comentado, algunos estudios sugieren que CRB3 es capaz de iniciar la formación de las uniones ocluyentes, al anclar el resto de proteínas del complejo Crb a la membrana plasmática^{123, 227}. Nuestros datos indican que no sucede lo mismo con CRB2, pues su localización en la membrana plasmática es posterior al inicio de formación de estas uniones. Es posible que ambas puedan desarrollar papeles complementarios durante este proceso, que podrían venir determinados por sus diferencias en el dominio extracelular¹¹⁶. En cualquier modo, nuestras observaciones indican que la llegada de CRB2 a la membrana plasmática coincide con el momento en el que las células muestran el mayor grado de polarización y diferenciación analizado, por lo que sin duda, al menos CRB2 debería ser considerada más bien como marcador de una etapa avanzada de la polarización apicobasal y, por lo tanto, de un epitelio ya maduro.

Por lo tanto, la expresión y localización de las diferentes proteínas de los complejos de polaridad apical Par y Crb varía dependiendo del momento del proceso de polarización apicobasal de la célula, hecho que puede ser utilizado para diferenciar el estado en el que esta se encuentra. En el inicio del proceso, cuando aún la célula no muestra apenas

características polarizadas, se detectan en la membrana plasmática las proteínas del complejo Par, PAR3 y aPKC, y la proteína del complejo Crb, PATJ, en el citoplasma. A continuación, cuando la célula se encuentra en un momento intermedio en el proceso de polarización, y muestra cierto grado de polaridad, PATJ y PALS1 se localizan junto con las proteínas del complejo Par en la membrana plasmática, pero no así CRB2, que se encuentra principalmente en el citoplasma. Es, finalmente, cuando la célula muestra el mayor grado de diferenciación y polarización apicobasal, cuando encontramos localizados en la membrana plasmática a los complejos Par y Crb al completo, incluida CRB2.

4. La función de CRB2 durante el proceso de polarización apicobasal

La función del complejo Crb se encuentra regulada de forma coordinada entre las diferentes proteínas que lo forman. Gran parte de la información sobre su función ha sido obtenida mediante experimentos *in vivo*, donde se ha observado que la falta de cualquiera de los miembros desencadena la desestabilización del conjunto de proteínas del complejo y de las uniones celulares, y produce alteraciones en la polaridad apicobasal y en la diferenciación celular. Todo ello, finalmente causa la pérdida de la homeostasis del tejido, provocando, en último caso, la muerte celular^{141, 143, 144, 157, 184, 187, 190}. A pesar de la relevancia que se ha observado que tienen este grupo de proteínas en los organismos vivos, los experimentos *in vivo* aportan escasa información, y difícil de desentrañar, sobre los mecanismos moleculares directamente implicados en las degeneraciones observadas. Para ello, han sido muy útiles los estudios realizados *in vitro*; que han mostrado la existencia de una regulación mucho más sutil entre la función e interacción de las diferentes proteínas. Así, se han estudiado los mecanismos que, tras la pérdida de alguna de ellas, provocan la deslocalización de la membrana plasmática, o en algunos casos la disminución de la expresión, del resto de proteínas del complejo, y que finalmente, bajo determinadas circunstancias, conducen a la pérdida de las uniones celulares, de la polaridad apicobasal y, solo en algún caso, también a la integridad celular^{94, 140, 152, 158}.

Los diversos estudios realizados sobre la carencia de CRB2 *in vivo* muestran cómo su disfunción produce alteraciones severas de la homeostasis durante el desarrollo embrionario y en la etapa adulta^{138, 139, 141, 229}. Sin embargo, el nuestro es el primer estudio realizado sobre la función de CRB2 en células epiteliales *in vitro*, para lo que hemos analizado los efectos que produce el silenciamiento de la proteína desde el inicio del proceso de polarización

apicobasal. La carencia de CRB2 no afecta en ningún momento a los niveles de expresión de las proteínas β -catenina, Ocludina, PAR3 y PALS1, algo similar a lo que ocurre al silenciar proteínas del complejo Crb en modelos similares^{89, 158, 207, 210}. Todos los efectos observados ocurren durante la etapa avanzada de la polarización, cuando la proteína debería estar finalmente localizada en la membrana plasmática junto al resto de miembros del complejo Crb y Par. Esto abre la incógnita de si CRB2 desempeña alguna función mientras se encuentra localizada en el citoplasma, cuando aún no ha entrado a formar parte del complejo Crb en la membrana plasmática. La isoforma CRB3B, caracterizada por mostrar una secuencia aminoacídica distinta a la isoforma CRB3A en su extremo C-terminal debido a un *splicing* alternativo, tiene una localización citoplasmática desde donde interviene en el control de la citocinesis y la ciliogénesis de las células epiteliales¹²². Se desconoce si CRB2 puede sufrir una modificación similar, aunque sí se han detectado mecanismos de *splicing* alternativo que podrían generar proteínas CRB2 secretables¹¹⁵, pero nunca una isoforma con un extremo C-terminal diferente que pudiera realizar una función semejante a la de CRB3B. De ser así, el anticuerpo utilizado en este trabajo no discriminaría entre las dos isoformas, ya que reconocería aminoácidos comunes del dominio citoplasmático entre ambas proteínas. Sin embargo, la proteína CRB3B citoplasmática se localiza en el centrosoma, algo que nunca hemos observado para CRB2, y su silenciamiento produce la aparición de células multinucleadas¹²², lo que tampoco hemos observado durante nuestro estudio, por lo que la localización de CRB2 en el citoplasma parece que no está relacionada con funciones similares a las descritas para CRB3B. Curiosamente, sí se ha descrito cómo la proteína p60 AmotL2 es capaz de retener a CRB3 en el citoplasma cuando las células epiteliales pierden la polaridad apicobasal mediante la inhibición de su transporte por el complejo TRAPPII (Transport Protein Particle II) desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática²⁰⁸, por lo que creemos mucho más probable que la localización de CRB2 en el citoplasma se deba a un proceso de regulación similar a este.

Una de las principales funciones directamente atribuidas al complejo Crb desde los comienzos de su estudio ha sido el de ser un complejo clave para el establecimiento y mantenimiento de las uniones ocluyentes de las células epiteliales^{110, 112}. Sin embargo, nuestros resultados sirven para matizar esta afirmación, al menos para el papel de CRB2, ya que su llegada a la membrana plasmática influye positivamente en el mantenimiento de las uniones ocluyentes de las células epiteliales, pero no en su establecimiento, ya que el silenciamiento de CRB2, cuando la proteína tiene una localización citoplasmática, no evita

la formación de estas uniones. Creemos importante señalar que parte de la controversia generada alrededor de estas afirmaciones podría derivar del análisis de los resultados observados tras el silenciamiento de las proteínas del complejo Crb *in vitro*. En esos estudios previos se observó que las células polarizadas con defectos en alguna de estas proteínas reestablecen más lentamente las uniones ocluyentes tras realizar un procedimiento denominado *Calcium Switch Assay*^{91, 94, 145, 158, 160}, pero no muestran ninguna alteración durante el desarrollo normal del cultivo. Este procedimiento consiste en la retirada repentina del ion Ca^{2+} del medio de cultivo una vez que las células se encuentran polarizadas, lo que provoca la desintegración de las uniones celulares, dependientes de este ion; y a continuación la reposición del Ca^{2+} , que favorece su restablecimiento²³⁰. El *Calcium Switch Assay* provoca una reacción fisiológica en las células que les permite adecuarse a los diferentes cambios en el medio, que consiste, entre otros, en la endocitosis de las proteínas de las uniones celulares que son mantenidas en vesículas listas para ser devueltas a la membrana plasmática tras el restablecimiento de los niveles adecuados de Ca^{2+} en el medio^{231, 232}. Lo que es más interesante, el proceso de retorno de las proteínas endocitadas parece estar regulado, al menos en parte, por la proteína del complejo Par, PAR3⁷⁷, lo que subraya la importancia que tiene en el proceso la expresión previa de ciertos componentes de los complejos de polaridad. Por lo tanto, el restablecimiento de las uniones celulares que ocurre tras el *Calcium Switch Assay* podría ser considerado como un proceso intermedio entre el de su establecimiento o formación *de novo*, y el de mantenimiento, ya que gran parte de los miembros de estas estructuras son reciclados, y la célula mantiene algunas de las características polarizadas previas a las de su desorganización. Por lo tanto, CRB2, intervendría en el proceso de mantenimiento de las uniones ocluyentes, siendo estas mucho más sensibles a la falta de CRB2 que lo observado para el resto de proteínas del complejo Crb, pero no de su establecimiento; y falta por conocer su papel en el restablecimiento de las mismas.

Por otro lado, a pesar de los defectos que el silenciamiento de CRB2 causa en el mantenimiento de las uniones ocluyentes, no detectamos cambios en la TER, que viene determinado principalmente por el estado de este tipo de uniones²³³. Esto puede deberse a que el procedimiento seguido no es suficientemente sensible para advertir las alteraciones que el silenciamiento provoca, ya que este no es completo en todo el cultivo, por lo que la deslocalización de Ocludina tampoco lo es. La evaluación de este tipo de alteraciones se ha realizado habitualmente tras realizar el nombrado *Calcium Switch Assay*, que al ser un

procedimiento mucho más drástico permite observar diferencias que de otra manera no se observan⁹¹.

Analizando exclusivamente los efectos del silenciamiento de CRB2, no parece que esta proteína regule el mantenimiento o establecimiento de las uniones adherentes ni de la expresión o localización de PAR3, como se ha descrito para otros miembros del complejo Crb^{145, 158}, aunque sí se ha descrito una localización interdependiente entre PAR3 y PATJ en la membrana plasmática¹⁶⁰. Sin embargo, la llegada de CRB2 a la membrana plasmática tiene efectos sobre la estabilidad de PALS1 en la misma, ya que las células carentes de CRB2 en el momento de máxima polarización muestran una distribución parcheada de PALS1 en la membrana plasmática que contrasta con la distribución homogénea que presentan las células control. Este tipo de distribución de las proteínas del complejo Crb, desde nuestro conocimiento, no se ha observado previamente en experimentos *in vitro*, aunque los estudios realizados sobre la función de estas proteínas en la retina de ratón *in vivo* muestran una pérdida similar del complejo Crb en la membrana limitante externa^{141, 187}. El hecho de que la deslocalización de PALS1 no sea total, según muestran nuestros resultados, podría deberse a que parte del complejo está siendo mantenido por las funciones de CRB3 en esta localización, aunque no consiga una completa estabilización de la proteína en la membrana, ni de las uniones ocluyentes como ya hemos observado, pero se necesitan más experimentos que confirmen esta hipótesis.

Por último, nuestros resultados han demostrado que el posicionamiento de CRB2 en la membrana plasmática determina, en cierto modo, la salida del ciclo celular de las células epiteliales, ya que su falta en ese momento provoca un aumento en la proliferación celular de aproximadamente el 200 %. A pesar de la magnitud del incremento, este número sólo representa entre el 1 y el 2 % del total de células del cultivo, lo que puede explicar que no se aprecien diferencias en la densidad celular cuando CRB2 es silenciada, aunque de nuevo debemos tener en cuenta que el silenciamiento no es completo en todo el cultivo. Sin embargo, el mantenimiento continuado de este porcentaje de células en división podría causar graves perjuicios para la homeostasis de un epitelio *in vivo*, ya que es una de las principales causas de la aparición de tumores³³. De hecho, varias de las proteínas de los complejos de polaridad fueron descubiertos debido a su papel como supresores tumorales, por lo que su actuación en la regulación de la proliferación celular ha sido muy estudiada^{56, 150, 151, 234}. En concreto, CRB2 ha sido relacionado con un aumento de la proliferación durante el proceso de diferenciación celular en células de tejido nervioso^{140, 141}, pero esta es la primera

vez que se demuestra que este efecto también afecta a células epiteliales. El mecanismo por el cual interviene en este proceso aún se desconoce, pero estudios recientes han relacionado al complejo Crb con las rutas de señalización Notch^{124, 125, 133} e Hippo^{148, 149}, que regulan directamente el proceso de división y diferenciación en varios tipos celulares durante el desarrollo^{235, 236}. Curiosamente, el ratón CRB2 KO, a pesar de ser inviable, ya que la carencia de CRB2 produce letalidad del embrión durante su desarrollo, forma estructuras y órganos de un tamaño mayor que el silvestre¹³⁸, lo que, junto con el resto de resultados obtenidos en nuestro trabajo, abre la posibilidad a que CRB2 también participe en la regulación de estas rutas de señalización.

Nuestros resultados indican, por tanto, que la llegada de CRB2 a la membrana plasmática interviene en el mantenimiento de las uniones ocluyentes y de las proteínas del complejo Crb en la misma, pero no de las uniones adherentes y de los elementos del complejo Par; y que, además, determina la salida del ciclo celular de algunas células epiteliales diferenciadas.

5. Las consecuencias biológicas del silenciamiento de CRB2 en el epitelio pigmentario *in vivo*

Como mencionamos anteriormente, los cambios sutiles observados tras el silenciamiento de diferentes proteínas del complejo Crb *in vitro*, se traducen en importantes alteraciones de la homeostasis cuando la disfunción de las proteínas ocurre en un tejido *in vivo*. Hasta el momento, el único estudio realizado sobre el papel de alguna de las proteínas de polarización en el epitelio pigmentario indica que el silenciamiento de PALS1 en este tejido provoca alteraciones morfológicas y fisiológicas severas, como la vacuolización citoplasmática y el acortamiento de las microvellosidades de este tipo celular¹⁵⁷, pero nada se sabe sobre los efectos que provoca la carencia de alguna de estas proteínas sobre el resto de características celulares directamente relacionadas con la función del complejo Crb.

Los resultados que hemos obtenido al silenciar CRB2 en el epitelio pigmentario *in vivo* indican que las células infectadas en las que se ha silenciado CRB2 sufren alteraciones morfológicas y moleculares que conllevan una pérdida de la homeostasis en el espacio subretinal. Tras la liberación mediante inyección subretinal de los vectores lentivirales que contienen los shRNA, se produce una fuerte reacción glial y la muerte masiva de fotorreceptores, tanto en la zona de inyección como en las adyacentes en las retinas de los ratones de ambos grupos experimentales (resultados no mostrados). Esta fuerte reacción, debida al daño mecánico del procedimiento, enmascara los posibles efectos que pueda

provocar el silenciamiento de CRB2 en los primeros días tras la inyección. Sin embargo, 60 días después de la inyección, momento en el que hemos analizado los resultados de nuestros experimentos, ya se pueden detectar determinados cambios provocados por el silenciamiento de CRB2 en las células de epitelio pigmentario, diferentes a los de la lesión mecánica debida la inyección que se detectan en un primer momento. Estos efectos son: la pérdida de la morfología poliédrica y la deslocalización, más o menos severa, de las proteínas PAR3 y PALS1, pero no de ZO-1, de la membrana plasmática de este tipo celular. Esto contradice parcialmente los resultados obtenidos sobre la función de las proteínas del complejo Crb en la retina *in vivo*, ya que en estos estudios se demuestra que su falta provoca la desorganización, no solo de las proteínas de los complejos de polaridad, como sí ocurre en nuestro modelo, sino también de las uniones celulares presentes en la membrana limitante externa^{141, 142, 184, 187, 189, 190}. Además, como comentamos anteriormente, numerosos estudios *in vitro*, incluidos los presentados en esta tesis doctoral, apoyan el papel fundamental de las proteínas del complejo Crb en el establecimiento y mantenimiento de las uniones celulares en diferentes tipos celulares^{91, 94, 123, 158, 160}. Sin embargo, otros estudios en los que se ha silenciado tanto CRB2 como CRB3 durante el desarrollo embrionario del ratón muestran que la deficiencia en estas proteínas causa la deslocalización de diferentes proteínas de los complejos de polaridad apical dependiendo del tejido epitelial analizado, pero en ningún caso afecta a la formación y estabilidad de las uniones celulares^{138, 143, 144}. Por lo tanto, parece que tanto la expresión de las proteínas del complejo Crb, así como su función y el nivel de importancia en la regulación de ciertos procesos celulares, es dependiente del tejido y, probablemente también, de su contexto. Hasta lo que sabemos, esta es la primera vez que se relaciona la carencia de una proteína del complejo Crb con la pérdida de la típica morfología poliédrica epitelial. Si bien, como hemos comentado, existen indicios de una relación, al menos indirecta, entre el complejo Crb y la organización del citoesqueleto que podría explicar estos cambios^{225, 228}, el gran tamaño observado en algunas de estas células podría deberse también a que, tras un proceso de muerte celular, las células adyacentes ocupan los nuevos espacios abiertos. Sin embargo, no hemos detectado un aumento ni en la muerte celular ni en la proliferación de las células de epitelio pigmentario (resultados no mostrados), algo que sí se ha demostrado que ocurre tras el silenciamiento de CRB2 o PALS1 en otros tipos celulares *in vivo*^{141, 155}, por lo que se requieren nuevos estudios que respondan a esta pregunta.

Todos estos cambios que ocurren tras el silenciamiento de CRB2 en las células de epitelio pigmentario *in vivo*, van acompañados de una abundante migración de células microgliales al espacio subretinal, un proceso poco frecuente que solo ocurre en la edad avanzada o en determinadas patologías cuando se produce una activación proinflamatoria en esta zona de la retina¹⁷². Además de encontrar un mayor número de células microgliales, el silenciamiento de CRB2 en el epitelio pigmentario produce su activación a un fenotipo ameboide, fagocítico, que representan aproximadamente un 58 % del total en los ojos inyectados con el shCRB2, mientras que son solo cerca del 14 % del total en los inyectados con el shRNA control. El número medio de células microgliales ramificadas, no fagocíticas, en ambos grupos experimentales es similar, y representan cerca del 85 % del total de los ojos inyectados con el shCTR, lo que indica que es el silenciamiento de CRB2 el causante de la llegada y activación de prácticamente el total de células ameboides presentes en este grupo experimental, probablemente debido a los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en este tipo celular, mientras que la presencia del resto de células ramificadas se debe al efecto directo del daño causado por el proceso de inyección.

Sin embargo, no hemos detectado alteraciones evidentes en la retina neural que, generalmente, suceden a una activación inflamatoria excesiva²³⁷. Tanto la estructura general de la retina y en concreto de los fotorreceptores, el primer tipo celular que suele verse afectado tras lesiones en el epitelio pigmentario, como la expresión y localización de proteínas como GFAP o Bassoon, que suelen verse alterados con la pérdida general de la homeostasis en la retina²³⁷, son similares en ambos grupos experimentales. Por lo tanto, al menos a los 60 días después de la inyección, no parece que la pérdida de homeostasis en el espacio subretinal relacionada con el silenciamiento de CRB2 en el epitelio pigmentario afecte o se deba al mantenimiento de la homeostasis de la retina neural. Sin embargo no podemos descartar que, tras un periodo más largo, los cambios producidos en el epitelio pigmentario por la falta de CRB2 acaben afectando a la homeostasis de la retina neural, por lo que son necesarios nuevos experimentos que respondan a esta hipótesis.

Por lo tanto, a los 60 días del silenciamiento de CRB2 en el epitelio pigmentario *in vivo* se producen alteraciones morfológicas en las células de epitelio pigmentario y la deslocalización de las proteínas de los complejos Par y Crb, junto con la llegada al espacio subretinal de células microgliales fagocíticas, pero esto no causa la pérdida de la homeostasis de la retina o alteraciones estructurales evidentes en este tejido tras este periodo.

Conclusiones

1. El cultivo de células ChRPE desarrollado en el presente trabajo constituye un excelente modelo para el estudio de la biología de las células epiteliales en general, y del epitelio pigmentario en concreto, ya que, además de ser de fácil adquisición y cultivo, estas células muestran características propias de un epitelio altamente polarizado y diferenciado.
2. El anticuerpo dirigido contra CRB2 desarrollado en el presente trabajo es una herramienta válida para el estudio de la proteína CRB2, tanto humana como murina, y representa, hasta el momento, el único anticuerpo capaz de reconocer específicamente a esta proteína tanto por técnicas de inmunofluorescencia como por Western blot.
3. La proteína CRB2 es, hasta el momento, la única isoforma CRB detectada en el epitelio pigmentario. En este tejido completa el establecimiento del complejo Crb en las uniones ocluyentes durante el proceso de polarización apicobasal, desde donde regula la diferenciación de este tipo celular mediante la estabilización de estas uniones y del complejo Crb en la membrana plasmática, y mediante la promoción de su salida del ciclo celular.
4. CRB2 es esencial para el mantenimiento de la homeostasis de las células de epitelio pigmentario *in vivo*, ya que su falta provoca defectos en la organización morfológica y molecular de estas células, que conllevan un reclutamiento masivo de células microgliales y su activación en el espacio subretinal, y que podría ser determinante para el correcto funcionamiento de la retina.
5. CRB2 es una proteína clave para el desarrollo del fenotipo epitelial, caracterizado por su polarización apicobasal y diferenciación. Su falta en la célula ya madura produce cambios esenciales en ambas características por lo que resulta fundamental para el desarrollo de las funciones del epitelio. Por lo tanto, defectos en las funciones de CRB2 pueden ser desencadenantes de patologías de origen epitelial, como son diferentes tipos de tumores o, en el ojo, la degeneración macular asociada a la edad.

Bibliografía

1. Nelson WJ. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 422, 766-774 (2003).
2. St Johnston D, Ahringer J. Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell* 141, 757-774 (2010).
3. Knoblich JA. Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 849-860 (2010).
4. Arimura N, Kaibuchi K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 194-205 (2007).
5. Geneser F. *Histología*, Third edn. Editorial Médica Panamericana (2000).
6. Franke WW. Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a003061 (2009).
7. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17, 375-412 (1963).
8. Green KJ, Getsios S, Troyanovsky S, Godsel LM. Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000125 (2010).
9. Vinken M. Introduction: connexins, pannexins and their channels as gatekeepers of organ physiology. *Cell Mol Life Sci* 72, 2775-2778 (2015).
10. Vinken M, *et al.* Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1818, 2002-2008 (2012).
11. Nekrasova O, Green KJ. Desmosome assembly and dynamics. *Trends Cell Biol* 23, 537-546 (2013).
12. Kowalczyk AP, Green KJ. Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci* 116, 95-118 (2013).

13. Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127, 2525-2532 (2007).
14. Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W, Takai Y. Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion. *Semin Cell Dev Biol* 15, 643-656 (2004).
15. Ivanov AI, Naydenov NG. Dynamics and regulation of epithelial adherens junctions: recent discoveries and controversies. *Int Rev Cell Mol Biol* 303, 27-99 (2013).
16. Van Itallie CM, Anderson JM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol* 36, 157-165 (2014).
17. Raleigh DR, *et al.* Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell* 21, 1200-1213 (2010).
18. Garrido-Urbani S, Bradfield PF, Imhof BA. Tight junction dynamics: the role of junctional adhesion molecules (JAMs). *Cell Tissue Res* 355, 701-715 (2014).
19. Yano T, Matsui T, Tamura A, Uji M, Tsukita S. The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *J Cell Biol* 203, 605-614 (2013).
20. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103, 755-766 (1986).
21. Ando-Akatsuka Y, Yonemura S, Itoh M, Furuse M, Tsukita S. Differential behavior of E-cadherin and occludin in their colocalization with ZO-1 during the establishment of epithelial cell polarity. *J Cell Physiol* 179, 115-125 (1999).
22. Yamamoto T, *et al.* The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Biol* 139, 785-795 (1997).
23. Takai Y, Nakanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci* 116, 17-27 (2003).

24. Nekrasova OE, *et al.* Desmosomal cadherins utilize distinct kinesins for assembly into desmosomes. *J Cell Biol* 195, 1185-1203 (2011).
25. Burdett ID, Sullivan KH. Desmosome assembly in MDCK cells: transport of precursors to the cell surface occurs by two phases of vesicular traffic and involves major changes in centrosome and Golgi location during a Ca(2+) shift. *Exp Cell Res* 276, 296-309 (2002).
26. Liu Y, *et al.* Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 113 (Pt 13), 2363-2374 (2000).
27. Rajasekaran AK, Hojo M, Huima T, Rodriguez-Boulan E. Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol* 132, 451-463 (1996).
28. Ebnet K, *et al.* The cell polarity protein ASIP/ PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *EMBO J* 20, 3738-3748 (2001).
29. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143, 391-401 (1998).
30. Balda MS, Garrett MD, Matter K. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 160, 423-432 (2003).
31. Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 17, 453-458 (2005).
32. Aschauer L, *et al.* Delineation of the key aspects in the regulation of epithelial monolayer formation. *Mol Cell Biol* 33, 2535-2550 (2013).
33. McCaffrey LM, Macara IG. Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 21, 727-735 (2011).
34. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890 (2009).
35. Ye X, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol*, (2015).

36. Stoops EH, Caplan MJ. Trafficking to the apical and basolateral membranes in polarized epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 25, 1375-1386 (2014).
37. Apodaca G, Gallo LI, Bryant DM. Role of membrane traffic in the generation of epithelial cell asymmetry. *Nat Cell Biol* 14, 1235-1243 (2012).
38. Cao X, Surma MA, Simons K. Polarized sorting and trafficking in epithelial cells. *Cell Res* 22, 793-805 (2012).
39. van Meer G, Simons K. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J* 5, 1455-1464 (1986).
40. Harvey Lodish AB, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. Transport across Epithelia. In: *Molecular Cell Biology* (ed[^](eds). 4th edition edn. W. H. Freeman (2000).
41. Miyoshi J, Takai Y. Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778, 670-691 (2008).
42. Oriolo AS, Wald FA, Ramsauer VP, Salas PJ. Intermediate filaments: a role in epithelial polarity. *Exp Cell Res* 313, 2255-2264 (2007).
43. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition edn. Garland Science (2002).
44. Buendia B, Bre MH, Griffiths G, Karsenti E. Cytoskeletal control of centrioles movement during the establishment of polarity in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 110, 1123-1135 (1990).
45. Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS. Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52, 311-320 (1988).
46. Watts JL, *et al.* par-6, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3. *Development* 122, 3133-3140 (1996).
47. Tabuse Y, *et al.* Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125, 3607-3614 (1998).

48. Hung TJ, Kemphues KJ. PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* 126, 127-135 (1999).
49. Tepass U, Theres C, Knust E. crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* 61, 787-799 (1990).
50. Tepass U, Knust E. Crumbs and stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 159, 311-326 (1993).
51. Bhat MA, *et al.* Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell* 96, 833-845 (1999).
52. Roh MH, *et al.* The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol* 157, 161-172 (2002).
53. Pielage J, Stork T, Bunse I, Klambt C. The *Drosophila* cell survival gene discs lost encodes a cytoplasmic Codanin-1-like protein, not a homolog of tight junction PDZ protein Patj. *Dev Cell* 5, 841-851 (2003).
54. Bilder D, Perrimon N. Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 403, 676-680 (2000).
55. Bilder D, Li M, Perrimon N. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 289, 113-116 (2000).
56. Assemat E, Bazellieres E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D. Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* 1778, 614-630 (2008).
57. Su WH, Mruk DD, Wong EW, Lui WY, Cheng CY. Polarity protein complex Scribble/Lgl/Dlg and epithelial cell barriers. *Adv Exp Med Biol* 763, 149-170 (2012).
58. Humbert PO, *et al.* Control of tumourigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module. *Oncogene* 27, 6888-6907 (2008).
59. Santoni MJ, Pontarotti P, Birnbaum D, Borg JP. The LAP family: a phylogenetic point of view. *Trends Genet* 18, 494-497 (2002).

60. Kallay LM, McNickle A, Brennwald PJ, Hubbard AL, Braiterman LT. Scribble associates with two polarity proteins, Lgl2 and Vangl2, via distinct molecular domains. *J Cell Biochem* 99, 647-664 (2006).
61. Metais JY, Navarro C, Santoni MJ, Audebert S, Borg JP. hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell junctions of epithelial cells. *FEBS Lett* 579, 3725-3730 (2005).
62. Qin Y, Capaldo C, Gumbiner BM, Macara IG. The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *J Cell Biol* 171, 1061-1071 (2005).
63. Navarro C, *et al.* Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* 24, 4330-4339 (2005).
64. Nakagawa S, *et al.* Analysis of the expression and localisation of a LAP protein, human scribble, in the normal and neoplastic epithelium of uterine cervix. *Br J Cancer* 90, 194-199 (2004).
65. Pearson HB, *et al.* SCRIB expression is deregulated in human prostate cancer, and its deficiency in mice promotes prostate neoplasia. *J Clin Invest* 121, 4257-4267 (2011).
66. Godde NJ, *et al.* Scribble modulates the MAPK/Fra1 pathway to disrupt luminal and ductal integrity and suppress tumour formation in the mammary gland. *PLoS Genet* 10, e1004323 (2014).
67. Pearson HB, *et al.* The polarity protein Scrib mediates epidermal development and exerts a tumor suppressive function during skin carcinogenesis. *Mol Cancer* 14, 169 (2015).
68. Caruana G. Genetic studies define MAGUK proteins as regulators of epithelial cell polarity. *Int J Dev Biol* 46, 511-518 (2002).
69. Zhu J, *et al.* Phosphorylation-dependent interaction between tumor suppressors Dlg and Lgl. *Cell Res* 24, 451-463 (2014).
70. Matsumine A, *et al.* Binding of APC to the human homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Science* 272, 1020-1023 (1996).

71. Adey NB, *et al.* Threonine phosphorylation of the MMAC1/PTEN PDZ binding domain both inhibits and stimulates PDZ binding. *Cancer Res* 60, 35-37 (2000).
72. Yamanaka T, *et al.* Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol* 13, 734-743 (2003).
73. Graybill C, Prehoda KE. Ordered multisite phosphorylation of lethal giant larvae by atypical protein kinase C. *Biochemistry* 53, 4931-4937 (2014).
74. Plant PJ, *et al.* A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat Cell Biol* 5, 301-308 (2003).
75. Kashyap A, *et al.* The human Lgl polarity gene, Hgl-2, induces MET and suppresses Snail tumorigenesis. *Oncogene* 32, 1396-1407 (2013).
76. Nam KH, Kim MA, Choe G, Kim WH, Lee HS. Deregulation of the cell polarity protein Lethal giant larvae 2 (Lgl2) correlates with gastric cancer progression. *Gastric Cancer* 17, 610-620 (2014).
77. Horikoshi Y, *et al.* Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells. *J Cell Sci* 122, 1595-1606 (2009).
78. Ohno S. Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 13, 641-648 (2001).
79. Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* 2, 531-539 (2000).
80. Mizuno K, *et al.* Self-association of PAR-3-mediated by the conserved N-terminal domain contributes to the development of epithelial tight junctions. *J Biol Chem* 278, 31240-31250 (2003).
81. Suzuki A, *et al.* Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J Cell Biol* 152, 1183-1196 (2001).

82. Gao L, Macara IG. Isoforms of the polarity protein par6 have distinct functions. *J Biol Chem* 279, 41557-41562 (2004).
83. Gao L, Macara IG, Joberty G. Multiple splice variants of Par3 and of a novel related gene, Par3L, produce proteins with different binding properties. *Gene* 294, 99-107 (2002).
84. Izumi Y, *et al.* An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J Cell Biol* 143, 95-106 (1998).
85. Chen J, Zhang M. The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity. *Exp Cell Res* 319, 1357-1364 (2013).
86. Lin D, *et al.* A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* 2, 540-547 (2000).
87. Takekuni K, *et al.* Direct binding of cell polarity protein PAR-3 to cell-cell adhesion molecule nectin at neuroepithelial cells of developing mouse. *J Biol Chem* 278, 5497-5500 (2003).
88. Kohjima M, *et al.* PAR3beta, a novel homologue of the cell polarity protein PAR3, localizes to tight junctions. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 641-646 (2002).
89. Chen X, Macara IG. Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat Cell Biol* 7, 262-269 (2005).
90. Itoh M, *et al.* Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol* 154, 491-497 (2001).
91. Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG, Margolis B. Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol* 5, 137-142 (2003).
92. Noda Y, *et al.* Human homologues of the *Caenorhabditis elegans* cell polarity protein PAR6 as an adaptor that links the small GTPases Rac and Cdc42 to atypical protein kinase C. *Genes Cells* 6, 107-119 (2001).

93. Adachi M, *et al.* Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight-junction proteins. *Mol Cell Biol* 29, 2372-2389 (2009).
94. Lemmers C, *et al.* CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell* 15, 1324-1333 (2004).
95. Wang Q, Hurd TW, Margolis B. Tight junction protein Par6 interacts with an evolutionarily conserved region in the amino terminus of PALS1/stardust. *J Biol Chem* 279, 30715-30721 (2004).
96. Sotillos S, Diaz-Meco MT, Caminero E, Moscat J, Campuzano S. DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* 166, 549-557 (2004).
97. Marques E, *et al.* Par6G suppresses cell proliferation and is targeted by loss-of-function mutations in multiple cancers. *Oncogene*, (2015).
98. Nolan ME, *et al.* The polarity protein Par6 induces cell proliferation and is overexpressed in breast cancer. *Cancer Res* 68, 8201-8209 (2008).
99. Xiao H, Liu M. Atypical protein kinase C in cell motility. *Cell Mol Life Sci* 70, 3057-3066 (2013).
100. Nagai-Tamai Y, Mizuno K, Hirose T, Suzuki A, Ohno S. Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells* 7, 1161-1171 (2002).
101. Gunaratne A, Thai BL, Di Guglielmo GM. Atypical protein kinase C phosphorylates Par6 and facilitates transforming growth factor beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 33, 874-886 (2013).
102. Qiu RG, Abo A, Steven Martin G. A human homolog of the *C. elegans* polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKC ζ signaling and cell transformation. *Curr Biol* 10, 697-707 (2000).
103. Coghlan MP, Chou MM, Carpenter CL. Atypical protein kinases Clambda and -zeta associate with the GTP-binding protein Cdc42 and mediate stress fiber loss. *Mol Cell Biol* 20, 2880-2889 (2000).

104. McCaffrey LM, Macara IG. Signaling pathways in cell polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, (2012).
105. Etienne-Manneville S, Hall A. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421, 753-756 (2003).
106. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11, 2295-2322 (1997).
107. Song H, *et al.* Transgenic expression of constitutively active RAC1 disrupts mouse rod morphogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55, 2659-2668 (2014).
108. Peterson FC, Penkert RR, Volkman BF, Prehoda KE. Cdc42 regulates the Par-6 PDZ domain through an allosteric CRIB-PDZ transition. *Mol Cell* 13, 665-676 (2004).
109. Zihni C, *et al.* Dbl3 drives Cdc42 signaling at the apical margin to regulate junction position and apical differentiation. *J Cell Biol* 204, 111-127 (2014).
110. Bazellieres E, Assemat E, Arsanto JP, Le Bivic A, Massey-Harroche D. Crumbs proteins in epithelial morphogenesis. *Front Biosci* 14, 2149-2169 (2009).
111. Le Bivic A. Why invent yet another protein complex to build junctions in epithelial cells? *Am J Physiol Cell Physiol* 305, C1193-1201 (2013).
112. Medina E, Lemmers C, Lane-Guermonprez L, Le Bivic A. Role of the Crumbs complex in the regulation of junction formation in *Drosophila* and mammalian epithelial cells. *Biol Cell* 94, 305-313 (2002).
113. den Hollander AI, *et al.* Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet* 23, 217-221 (1999).
114. Lemmers C, *et al.* hINAD1/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J Biol Chem* 277, 25408-25415 (2002).
115. Katoh M. Identification and characterization of Crumbs homolog 2 gene at human chromosome 9q33.3. *Int J Oncol* 24, 743-749 (2004).

116. Makarova O, Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B. Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene* 302, 21-29 (2003).
117. Watanabe T, Miyatani S, Katoh I, Kobayashi S, Ikawa Y. Expression of a novel secretory form (Crb1s) of mouse Crumbs homologue Crb1 in skin development. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 263-270 (2004).
118. Klebes A, Knust E. A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*. *Curr Biol* 10, 76-85 (2000).
119. Laprise P, *et al.* The FERM protein Yurt is a negative regulatory component of the Crumbs complex that controls epithelial polarity and apical membrane size. *Dev Cell* 11, 363-374 (2006).
120. Gosens I, *et al.* FERM protein EPB41L5 is a novel member of the mammalian CRB-MPP5 polarity complex. *Exp Cell Res* 313, 3959-3970 (2007).
121. Ling C, *et al.* The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10532-10537 (2010).
122. Fan S, *et al.* A novel Crumbs3 isoform regulates cell division and ciliogenesis via importin beta interactions. *J Cell Biol* 178, 387-398 (2007).
123. Fogg VC, Liu CJ, Margolis B. Multiple regions of Crumbs3 are required for tight junction formation in MCF10A cells. *J Cell Sci* 118, 2859-2869 (2005).
124. Herranz H, Stamatakis E, Feiguin F, Milan M. Self-refinement of Notch activity through the transmembrane protein Crumbs: modulation of gamma-secretase activity. *EMBO Rep* 7, 297-302 (2006).
125. Mitsuishi Y, *et al.* Human CRB2 inhibits gamma-secretase cleavage of amyloid precursor protein by binding to the presenilin complex. *J Biol Chem* 285, 14920-14931 (2010).
126. Barthet G, Georgakopoulos A, Robakis NK. Cellular mechanisms of gamma-secretase substrate selection, processing and toxicity. *Prog Neurobiol* 98, 166-175 (2012).

127. Ramkumar N, *et al.* Protein O-Glucosyltransferase 1 (POGLUT1) Promotes Mouse Gastrulation through Modification of the Apical Polarity Protein CRUMBS2. *PLoS Genet* 11, e1005551 (2015).
128. Letizia A, Ricardo S, Moussian B, Martin N, Llimargas M. A functional role of the extracellular domain of Crumbs in cell architecture and apicobasal polarity. *J Cell Sci* 126, 2157-2163 (2013).
129. Zou J, Wang X, Wei X. Crb apical polarity proteins maintain zebrafish retinal cone mosaics via intercellular binding of their extracellular domains. *Dev Cell* 22, 1261-1274 (2012).
130. van den Hurk JA, *et al.* Characterization of the Crumbs homolog 2 (CRB2) gene and analysis of its role in retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Mol Vis* 11, 263-273 (2005).
131. Grawe F, Wodarz A, Lee B, Knust E, Skaer H. The Drosophila genes crumbs and stardust are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development* 122, 951-959 (1996).
132. Chen CL, *et al.* The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15810-15815 (2010).
133. Richardson EC, Pichaud F. Crumbs is required to achieve proper organ size control during Drosophila head development. *Development* 137, 641-650 (2010).
134. Wodarz A, Grawe F, Knust E. CRUMBS is involved in the control of apical protein targeting during Drosophila epithelial development. *Mech Dev* 44, 175-187 (1993).
135. Robinson BS, Huang J, Hong Y, Moberg KH. Crumbs regulates Salvador/Warts/Hippo signaling in Drosophila via the FERM-domain protein Expanded. *Curr Biol* 20, 582-590 (2010).
136. Ribeiro P, Holder M, Frith D, Snijders AP, Tapon N. Crumbs promotes expanded recognition and degradation by the SCF(Slimb/beta-TrCP) ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E1980-1989 (2014).

137. den Hollander AI, *et al.* Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. *Am J Hum Genet* 69, 198-203 (2001).
138. Xiao Z, *et al.* Deficiency in Crumbs homolog 2 (Crb2) affects gastrulation and results in embryonic lethality in mice. *Dev Dyn* 240, 2646-2656 (2011).
139. Slavotinek A, *et al.* CRB2 mutations produce a phenotype resembling congenital nephrosis, Finnish type, with cerebral ventriculomegaly and raised alpha-fetoprotein. *Am J Hum Genet* 96, 162-169 (2015).
140. Boroviak T, Rashbass P. The apical polarity determinant Crumbs 2 is a novel regulator of ESC-derived neural progenitors. *Stem Cells* 29, 193-205 (2010).
141. Alves CH, *et al.* Loss of CRB2 in the mouse retina mimics human retinitis pigmentosa due to mutations in the CRB1 gene. *Hum Mol Genet* 22, 35-50 (2013).
142. Alves CH, *et al.* Targeted ablation of Crb2 in photoreceptor cells induces retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 23, 3384-3401 (2014).
143. Whiteman EL, *et al.* Crumbs3 is essential for proper epithelial development and viability. *Mol Cell Biol* 34, 43-56 (2014).
144. Charrier LE, Loie E, Laprise P. Mouse Crumbs3 sustains epithelial tissue morphogenesis in vivo. *Sci Rep* 5, 17699 (2015).
145. Roh MH, Fan S, Liu CJ, Margolis B. The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Sci* 116, 2895-2906 (2003).
146. Whiteman EL, Liu CJ, Fearon ER, Margolis B. The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene* 27, 3875-3879 (2008).
147. Fan S, *et al.* Polarity proteins control ciliogenesis via kinesin motor interactions. *Curr Biol* 14, 1451-1461 (2004).
148. Varelas X, *et al.* The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway. *Dev Cell* 19, 831-844 (2010).

149. Szymaniak AD, Mahoney JE, Cardoso WV, Varelas X. Crumbs3-Mediated Polarity Directs Airway Epithelial Cell Fate through the Hippo Pathway Effector Yap. *Dev Cell* 34, 283-296 (2015).
150. Karp CM, *et al.* Role of the polarity determinant crumbs in suppressing mammalian epithelial tumor progression. *Cancer Res* 68, 4105-4115 (2008).
151. Mao X, *et al.* Cell polarity protein CRB3 is an independent favorable prognostic factor for clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 46, 657-666 (2015).
152. Assemat E, *et al.* The multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) expression regulates cellular levels of the PALS-1/PATJ polarity complex. *Exp Cell Res* 319, 2514-2525 (2013).
153. Kamberov E, *et al.* Molecular cloning and characterization of Pals, proteins associated with mLin-7. *J Biol Chem* 275, 11425-11431 (2000).
154. Li Y, *et al.* Structure of Crumbs tail in complex with the PALS1 PDZ-SH3-GK tandem reveals a highly specific assembly mechanism for the apical Crumbs complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 17444-17449 (2014).
155. Kim S, *et al.* The apical complex couples cell fate and cell survival to cerebral cortical development. *Neuron* 66, 69-84 (2010).
156. Zollinger DR, Chang KJ, Baalman K, Kim S, Rasband MN. The Polarity Protein Pals1 Regulates Radial Sorting of Axons. *J Neurosci* 35, 10474-10484 (2015).
157. Park B, *et al.* PALS1 is essential for retinal pigment epithelium structure and neural retina stratification. *J Neurosci* 31, 17230-17241 (2011).
158. Straight SW, *et al.* Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol Biol Cell* 15, 1981-1990 (2004).
159. Ullmer C, Schmuck K, Figge A, Lubbert H. Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein. *FEBS Lett* 424, 63-68 (1998).
160. Shin K, Straight S, Margolis B. PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol* 168, 705-711 (2005).

161. Kolb H. Gross Anatomy of the Eye. (1995).
162. Masland RH. The neuronal organization of the retina. *Neuron* 76, 266-280 (2012).
163. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85, 845-881 (2005).
164. Kolb H. Photoreceptors. (1995).
165. Euler T, Haverkamp S, Schubert T, Baden T. Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nat Rev Neurosci* 15, 507-519 (2014).
166. Poche RA, Reese BE. Retinal horizontal cells: challenging paradigms of neural development and cancer biology. *Development* 136, 2141-2151 (2009).
167. Masland RH. The tasks of amacrine cells. *Vis Neurosci* 29, 3-9 (2012).
168. Xiang M, Zhou H, Nathans J. Molecular biology of retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 596-601 (1996).
169. Bringmann A, *et al.* Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25, 397-424 (2006).
170. Kolb H. Glial Cells of the Retina. (1995).
171. Graeber MB, Streit WJ. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 89-105 (2010).
172. Li L, Eter N, Heiduschka P. The microglia in healthy and diseased retina. *Exp Eye Res* 136, 116-130 (2015).
173. Santos AM, *et al.* Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 506, 224-239 (2008).
174. Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11, 775-787 (2011).

175. Fruttiger M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 10, 77-88 (2007).
176. Vieira V, *et al.* Differential regulation of Dlg1, Scrib, and Lgl1 expression in a transgenic mouse model of ocular cancer. *Mol Vis* 14, 2390-2403 (2008).
177. Gosens I, den Hollander AI, Cremers FP, Roepman R. Composition and function of the Crumbs protein complex in the mammalian retina. *Exp Eye Res* 86, 713-726 (2008).
178. Alves CH, Pellissier LP, Wijnholds J. The CRB1 and adherens junction complex proteins in retinal development and maintenance. *Prog Retin Eye Res* 40, 35-52 (2014).
179. Nguyen MM, Rivera C, Griep AE. Localization of PDZ domain containing proteins Discs Large-1 and Scribble in the mouse eye. *Mol Vis* 11, 1183-1199 (2005).
180. Cui S, Otten C, Rohr S, Abdelilah-Seyfried S, Link BA. Analysis of aPKC λ and aPKC ζ reveals multiple and redundant functions during vertebrate retinogenesis. *Mol Cell Neurosci* 34, 431-444 (2007).
181. Luo Y, Fukuhara M, Weitzman M, Rizzolo LJ. Expression of JAM-A, AF-6, PAR-3 and PAR-6 during the assembly and remodeling of RPE tight junctions. *Brain Res* 1110, 55-63 (2006).
182. Koike C, *et al.* Function of atypical protein kinase C λ in differentiating photoreceptors is required for proper lamination of mouse retina. *J Neurosci* 25, 10290-10298 (2005).
183. Heynen SR, *et al.* CDC42 is required for tissue lamination and cell survival in the mouse retina. *PLoS One* 8, e53806 (2013).
184. van de Pavert SA, *et al.* Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *J Cell Sci* 117, 4169-4177 (2004).
185. Herranz-Martin S, *et al.* Immunocytochemical Evidence of the Localization of the Crumbs Homologue 3 Protein (CRB3) in the Developing and Mature Mouse Retina. *PLoS One* 7, e50511 (2012).

186. Gosens I, *et al.* MPP1 links the Usher protein network and the Crumbs protein complex in the retina. *Hum Mol Genet* 16, 1993-2003 (2007).
187. Mehalow AK, *et al.* CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Hum Mol Genet* 12, 2179-2189 (2003).
188. van de Pavert SA, *et al.* A single amino acid substitution (Cys249Trp) in Crb1 causes retinal degeneration and deregulates expression of pituitary tumor transforming gene Pttg1. *J Neurosci* 27, 564-573 (2007).
189. Pellissier LP, *et al.* Targeted ablation of CRB1 and CRB2 in retinal progenitor cells mimics Leber congenital amaurosis. *PLoS Genet* 9, e1003976 (2013).
190. Pellissier LP, *et al.* CRB2 acts as a modifying factor of CRB1-related retinal dystrophies in mice. *Hum Mol Genet* 23, 3759-3771 (2014).
191. Cho SH, *et al.* Genetic ablation of Pals1 in retinal progenitor cells models the retinal pathology of Leber congenital amaurosis. *Hum Mol Genet* 21, 2663-2676 (2012).
192. Bulgakova NA, Knust E. The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J Cell Sci* 122, 2587-2596 (2009).
193. Wert KJ, Lin JH, Tsang SH. General pathophysiology in retinal degeneration. *Dev Ophthalmol* 53, 33-43 (2014).
194. Jones BW, Marc RE. Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp Eye Res* 81, 123-137 (2005).
195. Milam AH, Li ZY, Fariss RN. Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 17, 175-205 (1998).
196. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795-1809 (2006).
197. den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FP. Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 27, 391-419 (2008).

198. Ambati J, Fowler BJ. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron* 75, 26-39 (2012).
199. Resource UP. (ed[^](eds) (2016).
200. Roh MH, Margolis B. Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization. *Am J Physiol Renal Physiol* 285, F377-387 (2003).
201. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31, 13-20 (1983).
202. Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Sarthy PV. Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25, 1321-1328 (1984).
203. van Rossum AG, *et al.* Pals1/Mpp5 is required for correct localization of Crb1 at the subapical region in polarized Muller glia cells. *Hum Mol Genet* 15, 2659-2672 (2006).
204. Pardossi-Piquard R, *et al.* Overexpression of human CRB1 or related isoforms, CRB2 and CRB3, does not regulate the human presenilin complex in culture cells. *Biochemistry* 46, 13704-13710 (2007).
205. Harder JL, Whiteman EL, Pieczynski JN, Liu CJ, Margolis B. Snail destabilizes cell surface Crumbs3a. *Traffic* 13, 1170-1185 (2012).
206. Kantardzhieva A, *et al.* MPP5 recruits MPP4 to the CRB1 complex in photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 2192-2201 (2005).
207. Schluter MA, *et al.* Trafficking of Crumbs3 during cytokinesis is crucial for lumen formation. *Mol Biol Cell* 20, 4652-4663 (2009).
208. Mojallal M, *et al.* AmotL2 disrupts apical-basal cell polarity and promotes tumour invasion. *Nat Commun* 5, 4557 (2014).
209. Marmorstein AD. The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic* 2, 867-872 (2001).
210. Wang Q, Chen XW, Margolis B. PALS1 regulates E-cadherin trafficking in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell* 18, 874-885 (2007).

211. Bacallao R, *et al.* The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J Cell Biol* 109, 2817-2832 (1989).
212. Le Bivic A, Quaroni A, Nichols B, Rodriguez-Boulan E. Biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2, a human intestinal epithelial cell line. *J Cell Biol* 111, 1351-1361 (1990).
213. Kuznetsova AV, Kurinov AM, Aleksandrova MA. Cell models to study regulation of cell transformation in pathologies of retinal pigment epithelium. *J Ophthalmol* 2014, 801787 (2014).
214. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* 62, 155-169 (1996).
215. Bonilha VL. Retinal pigment epithelium (RPE) cytoskeleton in vivo and in vitro. *Exp Eye Res* 126, 38-45 (2014).
216. Liao JL, *et al.* Molecular signature of primary retinal pigment epithelium and stem-cell-derived RPE cells. *Hum Mol Genet* 19, 4229-4238 (2010).
217. Sonoda S, *et al.* A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat Protoc* 4, 662-673 (2009).
218. Gibbs D, Williams DS. Isolation and culture of primary mouse retinal pigmented epithelial cells. *Adv Exp Med Biol* 533, 347-352 (2003).
219. Tilston-Lunel AM, *et al.* Crumbs 3b promotes tight junctions in an ezrin-dependent manner in mammalian cells. *J Mol Cell Biol*, (2016).
220. Ellenbroek SI, Iden S, Collard JG. Cell polarity proteins and cancer. *Semin Cancer Biol* 22, 208-215 (2012).
221. Rodriguez-Boulan E, Macara IG. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 225-242 (2014).
222. Wang Q, Margolis B. Apical junctional complexes and cell polarity. *Kidney Int* 72, 1448-1458 (2007).

223. Yamanaka T, *et al.* PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells* 6, 721-731 (2001).
224. Johnson K, Wodarz A. A genetic hierarchy controlling cell polarity. *Nat Cell Biol* 5, 12-14 (2003).
225. Shin K, Wang Q, Margolis B. PATJ regulates directional migration of mammalian epithelial cells. *EMBO Rep* 8, 158-164 (2007).
226. Wells CD, *et al.* A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell* 125, 535-548 (2006).
227. Esum IA, Martin C, Humbert PO. Scribble regulates an EMT polarity pathway through modulation of MAPK-ERK signaling to mediate junction formation. *J Cell Sci* 126, 3990-3999 (2013).
228. Ernkqvist M, *et al.* The Amot/Patj/Syx signaling complex spatially controls RhoA GTPase activity in migrating endothelial cells. *Blood* 113, 244-253 (2009).
229. Ebarasi L, *et al.* Defects of CRB2 Cause Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Am J Hum Genet* 96, 153-161 (2015).
230. Gumbiner B, Simons K. A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide. *J Cell Biol* 102, 457-468 (1986).
231. Nigam SK, Rodriguez-Boulon E, Silver RB. Changes in intracellular calcium during the development of epithelial polarity and junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6162-6166 (1992).
232. Vega-Salas DE, Salas PJ, Rodriguez-Boulon E. Exocytosis of vacuolar apical compartment (VAC): a cell-cell contact controlled mechanism for the establishment of the apical plasma membrane domain in epithelial cells. *J Cell Biol* 107, 1717-1728 (1988).
233. Balda MS, Matter K. Tight junctions. *J Cell Sci* 111 (Pt 5), 541-547 (1998).

- 234. Loie E, Charrier LE, Sollier K, Masson JY, Laprise P. CRB3A Controls the Morphology and Cohesion of Cancer Cells through Ehm2/p114RhoGEF-Dependent Signaling. *Mol Cell Biol* 35, 3423-3435 (2015).
- 235. Dong J, *et al.* Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 130, 1120-1133 (2007).
- 236. Pierfelice T, Alberi L, Gaiano N. Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks. *Neuron* 69, 840-855 (2011).
- 237. Cuenca N, *et al.* Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Prog Retin Eye Res* 43, 17-75 (2014).

English summary

1. CRB2 expression and localization in the RPE

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

CRB2 completes a fully expressed Crumbs complex in the Retinal Pigment Epithelium

Received: 09 March 2015
Accepted: 26 August 2015
Published: 25 September 2015

Antonio E. Paniagua, Saúl Herranz-Martín[†], David Jimeno[‡], Ángela M. Jimeno, Saray López-Benito, Juan Carlos Arévalo, Almudena Velasco, José Aijón & Concepción Lillo

The CRB proteins CRB1, CRB2 and CRB3 are members of the cell polarity complex Crumbs in mammals that together with Scribble and Par complexes establish the polarity of a variety of cell types. Although many members of the Crumbs complex proteins are expressed in the retinal pigment epithelium (RPE), and even though the mRNA of CRB2 has been detected in ARPE-19 cells and in the RPE/Choroid, to date no CRB protein has yet been found in this tissue. To investigate this possibility, we generated an antibody that specifically recognize the mouse CRB2 protein, and we demonstrate the expression of CRB2 in mouse RPE. Confocal analysis shows that CRB2 is restricted to the apicolateral membrane of RPE cells, and more precisely, in the tight junctions. Our study identified CRB2 as the member of the CRB protein family that is present together with the rest of the components of the Crumbs complex in the RPE apico-lateral cell membrane. Considering that the functions of CRB proteins are decisive in the establishment and maintenance of cell-cell junctions in several epithelial-derived cell types, we believe that these findings are a relevant starting point for unraveling the functions that CRB2 might perform in the RPE.

Cell polarity is a known property of cells from unicellular and multicellular organisms, defined as an asymmetry in cell shape, protein distribution and cell function¹. In multicellular organisms, cell polarization is essential both in the embryonic stage and adulthood for the proper performance of a wide range of cellular processes as diverse as synaptic communication between neurons^{2,3}, the formation of epithelial barriers to maintain tissue homeostasis⁴ and the proper distribution of cellular components during cell division¹. Therefore, cell polarity must be a highly controlled process, which is achieved by cell-surface landmarks that adapt core pathways for the correct assembly of the cytoskeleton and protein transport. These cell-surface landmarks are thought to be composed of a few evolutionary conserved proteins included in three polarity protein complexes named the Scribble, Par and Crumbs complexes^{1,3,5–7}.

The Crumbs gene was initially identified in *Drosophila*, where it encodes a transmembrane protein that determines apicobasal polarity in embryonic epithelial cells⁸ and controls the integrity of adherens junctions in the adult fly eye⁹. *Drosophila* Crumbs contains a large extracellular domain, a transmembrane portion and a short intracellular portion^{8,10–12}, which acts as an anchoring point for the assembly of the intracellular Crumbs complex^{10,13,14}. The Crumbs complex is typically composed by PALS1, PATJ and the Crumbs homologs (CRB) proteins^{15,16}; and plays a crucial role in apical domain specification of the plasma membrane^{3,8,17}. To date, CRB proteins have been identified in several organisms, ranging from invertebrates to mammals, showing that they are highly evolutionary conserved proteins^{10,15,18,19}. In mammals, the CRB family is composed of three members: CRB1, CRB2 and CRB3^{20–22}. All three CRB proteins share the highly conserved intracellular domain, and whereas CRB1 and CRB2 have a large

Institute of Neurosciences of Castilla y León, IBSAL, Cell Biology and Pathology, University of Salamanca, 37007, Salamanca, Spain. [†]Present address: Sheffield Institute for Translational Neuroscience (SITraN), Department of Neuroscience, University of Sheffield, 385a Glossop Road, Sheffield S10 2HQ, United Kingdom. [‡]Present address: Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer-Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-USAL, Salamanca, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.L. (email: conlillo@usal.es)

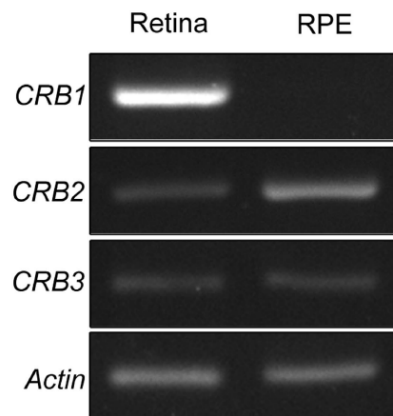


Figure 1. *Crb1*, *Crb2*, *Crb3* and *Actin* mRNA amplification in retina and RPE by RT-PCR assays. *Crb2* and *Crb3* are transcribed into mRNA in both retina and RPE while *Crb1* mRNA is transcribed in retina but not in the RPE. *Actin* amplification levels are similar in both tissues.

extracellular component CRB3 lacks this part^{15,20–22}. CRB proteins have been described to be essential for many cellular processes as the early embryonic development²³, formation and maintenance of tight junctions^{24–26} or cell division and ciliogenesis^{27–29}. CRB1 has been extensively investigated because CRB1 mutations cause several human retinal dystrophies, such as Leber congenital amaurosis or type 12 Retinitis Pigmentosa^{22,30,31}. In the mouse retina CRB2 is also essential for the correct expression and location of the adherens junctions proteins and removal of mouse *Crb2* from retinal progenitor cells shows abnormal lamination of the neuroepithelial layer during development and a progressive thinning of the photoreceptor layer in adulthood^{32,33}.

The Retinal Pigment Epithelium (RPE) is a highly polarized tissue that is essential for the maintenance of retinal homeostasis^{34,35}. As a polarized epithelium, it expresses some of the Crumbs complex members such as MPP1, PATJ, EPB41L5 and PALS1^{36–39} but, unless CRB proteins are necessary for the anchorage of the Crumbs complex to the cell membrane⁷, none of them have been detected in this tissue so far. To investigate the expression of one of the members of the CRB protein family in this tissue, we designed and generated an antibody that specifically recognize the mouse CRB2 protein inasmuch as, to date, all antibodies used in previous studies have failed to fully elucidate the expression of this protein in this tissue.

Results

Analysis of the expression pattern of the *Crb2* and *Crb3* genes. The expression pattern of the three *Crb* genes (*Crb1*, *Crb2* and *Crb3*) was determined by reverse transcription (RT)-PCR on mRNA samples from mouse retina and RPE. The three transcripts are present in the retina as expected but we also found that out of the three, CRB2 and CRB3 are also expressed in the RPE (Fig. 1).

Specificity of the CRB2 antibody. To accomplish the present study, we designed a new antibody to specifically recognize and discriminate the CRB2 protein. Our goal was to try to improve the detection pattern and disparities both by immunofluorescence (IF) and western blot (WB) techniques, shown in previous works that used different sets of custom-made antibodies that recognized diverse parts of the extracellular domains^{33,36,40–43}.

The specificity of the CRB2 antibody was determined by WB assays. Total protein extracts from brain and retina, where the presence of CRB2 has been described were employed as positive controls for the expression of CRB2^{36,40}. Proteins obtained from skeletal muscle, where CRB2 mRNA has not been detected²¹, were used as a negative control. The CRB2 antibody detected two bands in brain and retina extracts, one with an approximate molecular weight of 150 kDa (arrow in Fig. 2A) and another one of approximately 260 kDa (arrowhead in Fig. 2A). These two bands were absent in the muscle protein extract (Fig. 2A). Furthermore, the same bands were also identified in the RPE protein extract (Fig. 2A). To rule out any possible cross-contamination between the RPE and retinal tissues, the synapsin protein was chosen as a control marker for nervous tissue and RPE65 was selected as an RPE-specific indicator (Fig. 2A). In addition, we used PALS1 to test the expression of a member of the Crumbs complex, which we found in brain, retina and the RPE but not in muscle (Fig. 2A). Different methods were employed to verify the specificity of the CRB2 antibody. First, we carried out a peptide competition assay, observing the almost complete disappearance of the two bands in the control tissues and in the RPE (Fig. 2B). We

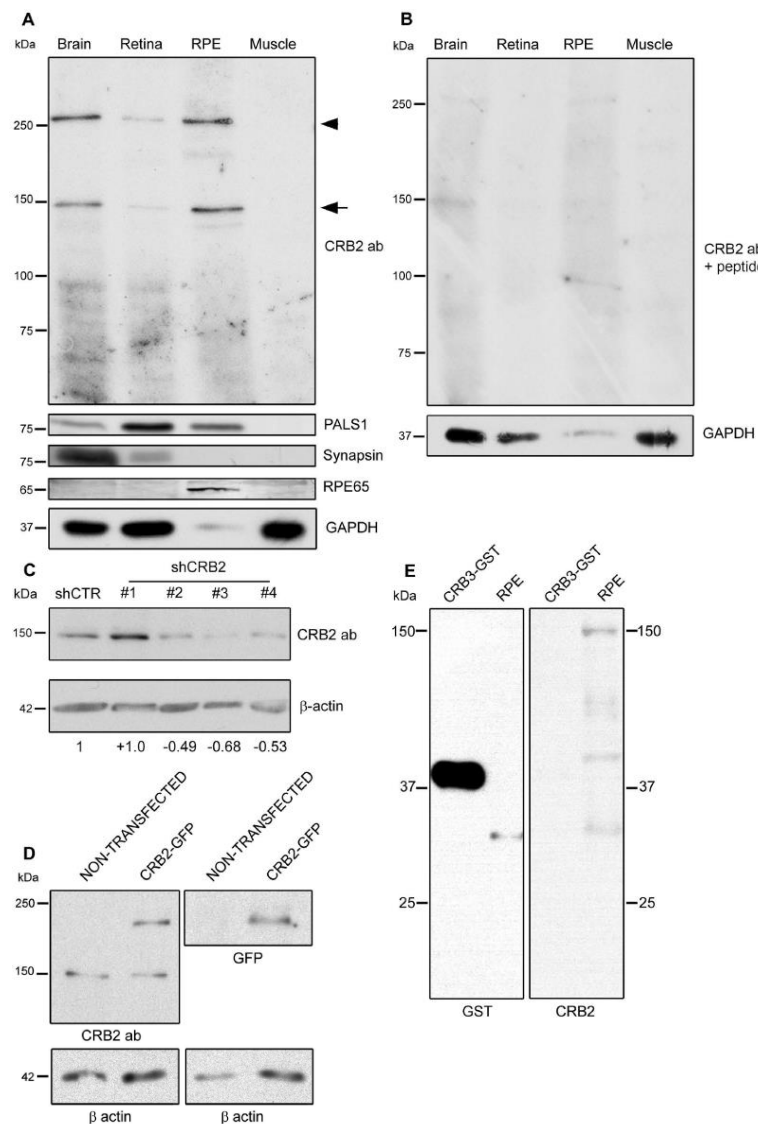


Figure 2. Specificity analyses for the CRB2 antibody and CRB2 expression in the RPE. (A) The CRB2 antibody detects two bands with approximate molecular weights of 150 kDa (arrow) and 260 kDa (arrowhead) in brain, retina and RPE, but not in muscle. A member of the Crumbs complex, PALS1, is also expressed in the same tissues. The synapsin protein, only present in brain and retina lysates, and the expression of RPE65, only found in RPE, rule out any cross-contamination between retinal and RPE lysates. (B) In the peptide competition assay, the two bands detected at 150 and 260 kDa with the CRB2 antibody disappear. GAPDH was used as loading control. (C) CRB2 antibody detects a band of approximately 150 kDa in N2A cells. The intensity of this band decreases in cells transfected with three different shRNAs of a set of four (shCRB2) when compared with shRNA control (shCTR) transfected cells. The numbers indicate the CRB2 increase/decrease values relative to the shCTR. (D) CRB2-GFP fused protein overexpressed in HEK293 cells (CRB2-GFP) is detected as a band of 180 kDa by CRB2 and GFP antibodies but not in non-transfected HEK293 cells. The 150 kDa band is also detected by the CRB2 antibody in both transfected and non-transfected HEK293 cells. β -actin was used as loading control. (E) CRB3 protein fused to GST is detected with GST antibody at 40 kDa but not with CRB2 antibody. RPE tissue was used as a control of CRB2 antibody viability.

then knocked down endogenous CRB2 in Neuro-2A (N2A) cells by transfecting them with four different shRNA sequences against *Crb2* mRNA. Three of the four sequences showed a great effectivity knocking down *Crb2*, since the intensity of the 150kDa band detected in N2A lysates decreased a $49,06\% \pm 7,19$ for shCRB2#2, a $68,71\% \pm 3,90$ for shCRB2#3 and a $53,71\% \pm 14,39$ for shCRB2#4 (Fig. 2C). We also overexpressed the CRB2 protein fused to GFP in Human embryonic kidney (HEK) 293 cells. The WB analysis revealed the exogenous protein at an approximate molecular weight of 180kDa in the transfected cells using both the CRB2 antibody and the GFP antibody (Fig. 2D) and the endogenous CRB2 protein at 150kDa in both transfected and non-transfected HEK293 cells (Fig. 2D). Finally, we wanted to discard the possibility that the CRB2 antibody may recognize the CRB3 protein due to aminoacidic similarities. To do this, we loaded a commercial CRB3 protein fused to GST and performed immunoblotting with the CRB2 antibody. The CRB2 antibody did not recognize the CRB3-GST fusion protein, which was effectively detected with the GST antibody (Fig. 2E). We then discarded the possibility that the CRB2 antibody may cross-react with the CRB3 protein.

Therefore, the CRB2 antibody specifically detects CRB2 at least at 150kDa that confirms the expression of CRB2 in mouse RPE cells by WB.

CRB2 is located apically to the proteins of the adherens junctions in the RPE. In order to determine the localization of CRB2 in the RPE, we performed detailed confocal imaging analyses in RPE flatmounts. The co-immunolabeling with RPE65 (Fig. 3A), a marker specific for RPE cells, and the CRB2 antibody (Fig. 3B) showed that CRB2 was mostly located in the plasma membrane of the RPE cells (Fig. 3C), although we also found a faint, scattered labeling in the cytoplasm (arrowheads in Fig. 3B,D,F). All this labeling disappeared with the peptide competition assay (Fig. 3E).

We then investigated the precise location of CRB2 in the RPE plasma membrane. To do this, we carried out double and triple IF experiments in RPE flatmounts for CRB2 and several apical membrane and cell junctions markers present in these cells, such as PALS1 (Fig. 3G), phalloidin (Fig. 3H), which labels the F-actin associated with these junctions and p120 catenin (Fig. 4). The triple IF experiments revealed that phalloidin, PALS1 and CRB2 colocalized, all of them being detected in the same area of the RPE plasma membrane (Fig. 3F–J). Nevertheless, the CRB2 protein showed a more restricted and scattered distribution in the plasma membrane than the other proteins, which delineated the entire perimeter of the cell junctions' area.

To obtain a more detailed visualization of the exact location of CRB2 in the apicolateral membrane of RPE cells, we analyzed the three-dimensional distribution of this protein, together with some cell adhesion proteins, such as p120 catenin (Fig. 4), ZO1 and phalloidin (unpublished data). To accomplish this, we obtained Z-stack images by confocal microscopy, and found p120 catenin located in the apicolateral membrane (Fig. 4B,E,H,K) while CRB2 was located in a narrower range apically to p120 catenin (Fig. 4A,D,G,J). These proteins did colocalize, but in a very specific area (Fig. 4G–I). Likewise, the orthogonal view of the Z-stack (Fig. 4M) and the three-dimensional reconstruction performed with these images to pinpoint the location of the two proteins demonstrated that CRB2 was positioned apically to p120 catenin in the apicolateral membrane of RPE cells (Fig. 4N,O and Video file).

Discussion

As a polarized epithelium, the RPE expresses some of the Crumbs complex proteins^{20,36–40}, although, to date, none of the three CRB protein family members had been detected. Given the relevance that CRB proteins have shown in other cells or tissues^{22,23,44} and the importance of polarity for the RPE functions^{45,46}, the aim of this study was to unravel whether CRB2 is expressed in the mouse RPE and to determine its precise localization in this tissue.

In the present work, we have demonstrated the presence of the mRNA of *Crb2* in the mouse RPE and confirmed the absence of *Crb1* mRNA, in agreement with a previous work where *Crb2* mRNA was detected in RPE/Choroid and ARPE19²¹. Additionally, the presence of *Crb3* mRNA in the RPE observed in the present study had not been described in previous studies. However, subsequent studies have not been able to detect the expression of any of these proteins in the RPE. One of the reasons that could explain this circumstance is that the specific conditions used in the detection protocols when using these antibodies were not the most suitable for the antibodies and techniques that were used. Many of these antibodies are directed against the extracellular domain of CRB2, none of them have been commercialized so far or have been designed to recognize the human CRB2 protein^{33,36,40–43}. Furthermore, there is substantial controversy regarding the precise molecular weight of this protein, since these publications either do not show any WB analysis, or in the case they do, these studies do not agree in conferring a certain molecular weight to CRB2 or show many bands of diverse molecular weight in different tissues^{40–42,47}. To try to solve these inconsistencies and to elucidate the presence of CRB2 in the mouse RPE, we designed and characterized a specific antibody against the cytoplasmic domain of mouse CRB2.

Our WB data support the expression of the CRB2 protein in the RPE, as well as in the brain and retina, where it had been already detected^{33,36,40}. Even though the predicted molecular weight for CRB2 is 134kDa (Universal Protein Resource), we have detected two bands in these tissues, one of them slightly under 150kDa and the other one above 260kDa. These results are partly consistent with those reported in a previous study in which CRB2 was detected as three bands of 80, 150 and 200–220kDa in mouse embryonic stem cells⁴² and with an additional band of 220kDa in forebrain lysates of mouse embryos

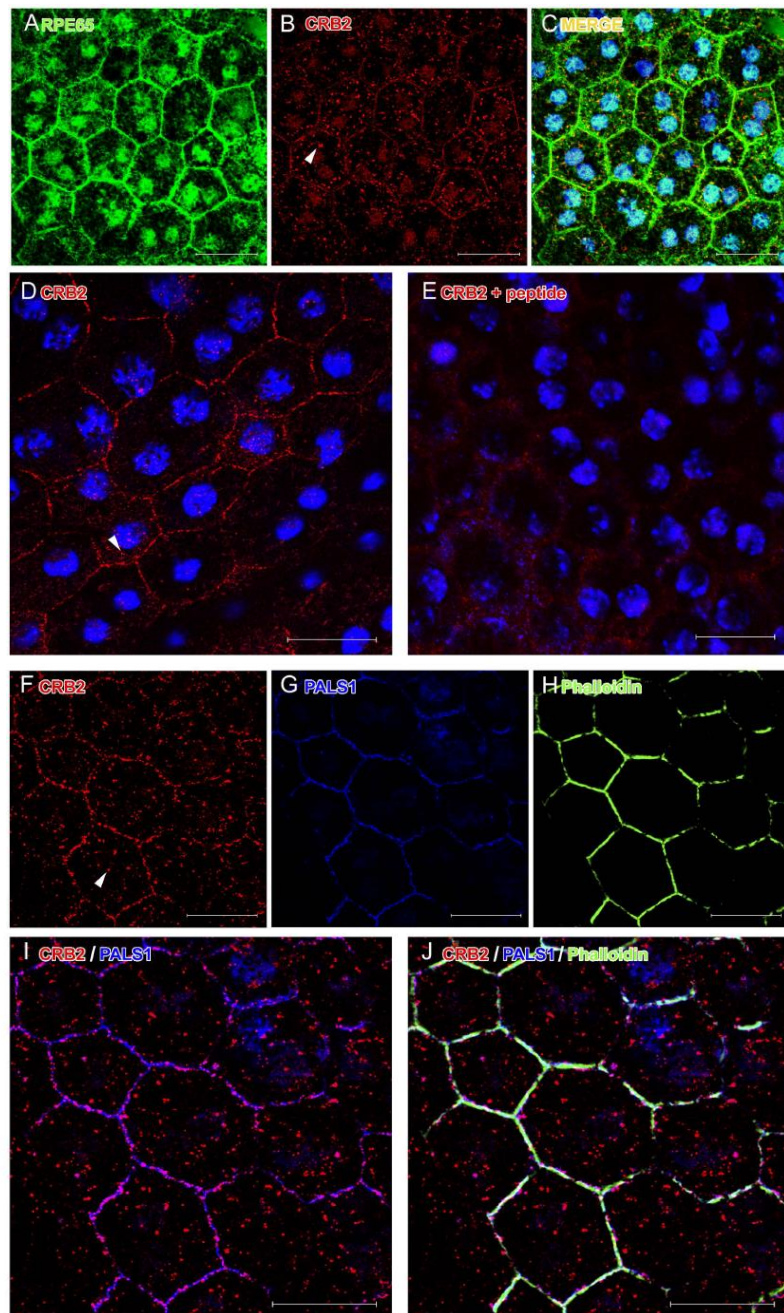


Figure 3. CRB2 detection by IF on RPE flatmounts. RPE65 (A) is expressed in RPE cells together with CRB2 (B). (C) Merged images of RPE65 and CRB2 labeling and nuclei in blue. (D) CRB2 is located in the cell membrane of RPE cells. (E) The CRB2 labeling disappears after the peptide competition assay. Nuclei are stained in blue in (D,E). Triple IF showing CRB2 (F), PALS1 (G) and phalloidin (H) in the cell membrane. CRB2 and PALS1 colocalize in the cell membrane (I) together with phalloidin (J). Arrowheads in (B,D,F): scattered punctate labeling for CRB2 in the cytoplasm. Scale bars: 20 μ m.

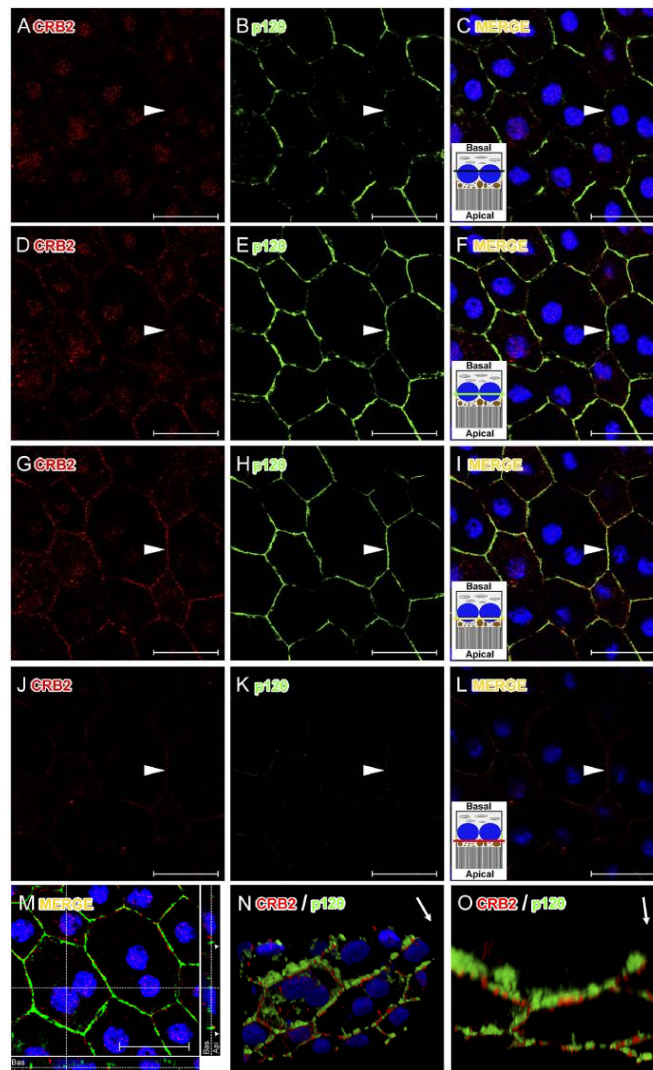


Figure 4. Accurate location of CRB2 in the cell membrane of RPE cells. (A–L) Confocal microscopy Z-stack images of a triple immunolabeling for CRB2 (red), p120 catenin (green) and nuclei (blue) in RPE flatmounts obtained from the basal to apical cell sides with a step size of 300 nm. In the lateral membrane, p120 catenin is expressed more basally (B,E,H) and CRB2 is located apically (G,J). None of these proteins is located at the basal side of the cell membrane (arrowheads in A–C). Towards the apical side, p120 catenin appears (arrowhead in E,F), but not CRB2 (arrowhead in D). Both proteins colocalize in the cell membrane across a short range (arrowheads in G–I). CRB2, but not p120 catenin, is localized at the apical-most side of the cell membrane analyzed (arrowheads in J–L). In (C,F,I,L) an RPE cell scheme represents the relative position where each image was acquired. The black line in C represents the portion of the RPE where none of the proteins studied are located. The green line in F is where only p120 catenin is located. The yellow line in (I) is where both proteins (p120 catenin, green and CRB2, red) colocalize. The red line in (L) represents the area of the RPE cell where CRB2, but not p120 catenin, is present. (M) maximal projection and orthogonal view of the Z-stacks shows the location of the two proteins (arrowheads) in the apical side of the cells. (N) a three-dimensional reconstruction of the Z-stack shows that CRB2 is located apically to p120 catenin. (O) intracellular staining was removed to facilitate the examination of the membrane labeling. Arrows in the upper right margin in (N,O) indicate the orientation from basal (base of the arrow) to apical side of the cells (arrowhead). A movie of this 3D reconstruction is available on “Video file”. Scale bars: 20 μm.

of 13.5 days⁴⁰. The overexpression of CRB2 fused to GFP in HEK293 showed the exogenous protein at 180 kDa that was detected with both, CRB2 and GFP antibodies. The endogenous 150 kDa band was clearly identified in the two cell lines used for the different experiments in the present study, which was effectively knocked down in the N2A cells, confirming the specificity of the CRB2 antibody. Despite the fact that this antibody was generated to detect the mouse protein, it seems that it also distinguishes the human CRB2 in HEK293 cells, probably because of the high similarity of their cytoplasmic domains. However, we could not detect the heaviest 260 kDa band in any of the cell lines employed in our study, becoming more difficult to confirm the specificity of the 260 kDa band detected in tissue lysates. The complexity of the cell organization required in a tissue differs from that of a cell culture, and that could explain the presence of different isoforms, post-translational modifications or even protein aggregates in tissue protein extracts. Further studies are needed to confirm this observation.

Regarding the detection of the CRB2 protein in tissue, although previous studies have shown the expression and location of CRB2 in retina sections that include the RPE cells tissue layer^{32,33,36,48}, none of them has reported the expression of this protein in the RPE. This could be due to the conditions of the procedures, as the tissue processing (e.g., retina cryosections, RPE flatmounts), the fixation time, the fixative concentration or the antibodies used, since these conditions are critical for the preservation and detection of many antigens. In fact, a clear example of the convenience of using the appropriate tissue processing is that we were not able to detect CRB2 in RPE cells in tissue cryosections (data not shown) but only in RPE flatmounts. Interestingly, this observation is not unusual since one of the Crumbs complex proteins, PALS1, was not detected in the RPE in retina sections either^{38,49–51} but only using the RPE flatmounts procedure³⁸. The detailed confocal microscopy analysis of RPE flatmounts for CRB2 and proteins such as p120 catenin and PALS1 and 3D reconstruction analyses allowed us to discern that CRB2 is located in a narrow area situated apically to the zone where the adherens junction are located, what is in agreement with the location of Crumbs complex proteins in other cells^{25,52–54}.

The Crumbs complex protein PALS1 has been described to be essential for the RPE and retina structure maintenance^{38,55}. Interestingly, we found that the staining of CRB2 and PALS1 did not completely overlap, since CRB2 showed a patchy distribution in the RPE cell membrane, differing from the more continuous PALS1 staining throughout it. These data suggest that in the RPE cell membrane PALS1 may not always be bound to CRB2. We have demonstrated that *Crab3* mRNA is expressed in these cells so it is possible that CRB3 protein could be also expressed in the RPE cells since it has been detected in several epithelial cell lines^{20,24,44,54,56}. The co-expression of both members of the CRB family in the same cell has already been reported^{15,49} and although both proteins are very similar, CRB3 (28 kDa), which contains a shorter extracellular portion²⁰ is involved in many diverse processes, as cell division or ciliogenesis in other epithelial cells^{27,29}. This way, the expression of another member of the CRB protein family is still unexplored and needs to be elucidated to better understand the mechanisms in which these two CRB proteins might be implicated.

Our IF experiments in RPE flatmounts also show a scattered and punctate cytoplasmic labeling for CRB2 on these cells. Previous studies in *Drosophila* reported that an active traffic between the plasma membrane and cytoplasmic vesicles is necessary for the control of Crumbs protein function^{57,58}. In mammalian MDCKII (Madin-Darby Canine Kidney II) cells a noteworthy trafficking of CRB3 protein has recently been demonstrated, where an important amount of this protein has been detected in the cytoplasm as well as in the apical cell membrane⁵⁶. Our results suggest that the punctate labeling obtained for CRB2 in the cytoplasm of RPE cells could correspond to the different spots of localization of the protein while travelling from or towards the membrane, although further studies are needed to prove this observation.

We have tried to confirm the specificity of the CRB2 immunolabeling in IF experiments by knocking down this protein from N2A cells. Unfortunately, maybe due to the incomplete knock down by using this procedure together with the fact that IF is mainly qualitative and not quantitative enough, we have not been able to get definitive conclusions out of the IF experiments after knocking down CRB2 from N2A cells. However, both the precise location of CRB2 in RPE cells that is in agreement with the location of the Crumbs complex proteins in epithelial cells^{20,25,52–54} and all the experiments performed by WB showing the distinct expression of CRB2, strongly support the specificity of the IF labeling for CRB2 in RPE cells.

In conclusion, our findings are relevant because this is the first time that any of the CRB proteins have been found in RPE. To date, RPE cells were an exception, since it is a cell type where some members of the Crumbs complex proteins but none of the CRB proteins had been detected. This way we have demonstrated that, at least in the RPE, a fully Crumbs complex is expressed, probably being CRB2 the protein that anchors the polarity complex to the cell membrane. In light of this, considering the importance of proper RPE cell adhesion organization and polarization for the maintenance of retinal homeostasis, and bearing in mind the retinal disorders caused by the improper functioning of Crumbs complex in these tissues, we believe that these findings are a relevant starting point for gaining further insight into a possible role of these proteins in the correct performance of the functions of the RPE.

Materials and Methods

All procedures used in this work were in accordance with the guidelines of the European Communities Council Directive 2010/63/UE and the RD 53/2013 Spanish legislation for the use and care of animals. All the details of the study were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca.

Animals. For this study, we used 90-day-old adult wild-type C57BL/6J mice that were euthanized with carbon dioxide prior to tissue extraction.

RT-PCR analyses. To verify *Crb1*, *Crb2* and *Crb3* and *Actin* mRNA expression, four pairs of primers were designed from the corresponding gene sequences and used for RT-PCR analyses using mouse retina and RPE cDNA. *Crb1* (exon 6): Forward 5'-ACAAGTGGCTCCCATACAGG-3' and Reverse 5'-ACGAAATGCCATTCTCCATC-3', *Crb2* (exons 2–4): Forward 5'-GCAGATCACTACGAGTGCC-3' and Reverse 5'-CCGGAACCGTTGACCAG-3', *Crb3* (exons 2–4): Forward 5'-TAACAGCACCGGACCC-3' and Reverse 5'-ACTCCAGAAATGGAAAAGAC-3', *Actin*: Forward 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' and Reverse 5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3'. After the animals had been sacrificed, the eyes were dissected out, the cornea and lens were removed, the retina was extracted and the RPE was separated from the choroid using fine forceps. The retina and the RPE were lysed in TRIzol[®] LS Reagent (Life Technologies[™]) and total RNA was isolated following the manufacturer's instructions. Total RNA was treated with TURBO DNA-free[™] kit (Life Technologies[™]) to digest trace amounts of genomic DNA. Randomly primed cDNA synthesis was performed using the RETROscript[®] kit (Life Technologies[™]) in accordance with the manufacturer's instructions. Specific sequence amplifications of the *Crb1*, *Crb2*, *Crb3* and *Actin* genes were performed with PCR using 300 µg of cDNA and 0.2 µM to 0.5 µM of specific primers in 20 µl of PCR solution under the following conditions: an initial denaturation period of 3 minutes at 94 °C followed by an amplification period of 35 cycles for 45 seconds at 94 °C, 30 seconds for annealing at 49 °C in the case of *Crb1* pair of primers and 56 °C for *Crb2*, *Crb3* and *Actin* pairs of primers and 30 seconds at 72 °C, and a final extension timing of 10 minutes at 72 °C.

To analyze the RT-PCR reaction, 20 µl of each product was loaded onto a 2% agarose gel in the presence of ethidium bromide and visualized under a UV light transilluminator.

Negative controls such as minus-RT and a minus-template PCR ruled out any DNA contamination of the RNA samples or the PCR reagents.

Cell cultures and transfection. N2A cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% MEM Non-Essential Amino Acids, 1% penicillin/streptomycin and 1% sodium pyruvate. pLVTHM plasmid⁵⁹ encoding either the shRNA sequence 5'-cgcgTGCGCGCTTTGTAGGATTCTGttcaagagaCGAATCCTACAAAGCGCGCttttggaaat-3' from *Euglena gracilis* chloroplast that does not hybridize with any region of the mouse transcriptome as a negative control or the shRNAs sequences against mouse *Crb2*:

#1. 5'-cgcgTGCGCGCTTTGTAGGATTCTGttcaagagaACTTCTGTAGCCTGGCACttttggaaat-3'.

#2. 5'-cgcgTGACTTCTACTGCACCTGCTtcaagagaGCAGGTGCAGTAGAAGTCAttttggaaat-3'.

#3. 5'-cgcgCGAAGTGGATGAGGACGAAttcaagagaTTCGTCCTCATCCACTTCGttttggaaat-3'.

#4. 5'-cgcgCCACCAGAGGAGAGACTTAttcaagagaTAAGTCTCTCCTCTGGTGGttttggaaat-3', were

transfected into N2A cells with Lipofectamine[®] LTX and Plus[™] Reagent (Life Technologies[™]) following the manufacturer's instructions. Cell lysates were collected 36 hours after transfection as described below. Three different experiments were performed and quantified. Data are represented as means ± SEM (Standard Error of the mean).

HEK293 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% MEM Non-Essential Amino Acids, 1% penicillin/streptomycin and 1% sodium pyruvate. pCMV6-AC-GFP plasmid encoding the CRB2 protein with a C-terminal tGFP tag (OriGene Technologies) was transfected into HEK293 cells following the calcium phosphate method, as described in⁶⁰. Total proteins were collected 24 h post-transfection as described below.

Antibody production. The NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) was used to choose a unique antigenic amino acid sequence of the mouse CRB2 protein to design an antibody. The sequence of choice of the CRB2 protein, containing amino acids 1243 to 1256 with a cysteine at the N-terminal end, was sent to GenScript Corporation[™] for the generation and purification of the corresponding polyclonal antibody.

Protein extraction and Western blot analyses. The RPE, retina, a portion of brain, a fragment of skeletal muscle, N2A and HEK293 cells in culture were lysed in RIPA buffer (150 mM sodium chloride 1.0% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 50 mM Tris, pH 8.0) with protease inhibitor cocktail (1:1000, Sigma-Aldrich[™]). Each piece of tissue was homogenized in separate tissue grinders and maintained under constant shaking for 2 h at 4 °C. The resulting solutions were centrifuged at 15,000 g for 20 min at 4 °C. The supernatants were collected and the protein concentrations were assayed with Bradford's assay, and equal amount of proteins was loaded in each lane.

To discard the possibility that the CRB2 antibody may recognize the CRB3 protein due to aminoacidic similarities, we used 1 · 10⁻³ nmol of CRB3 fused to GST (Abnova) mixed with the same amount of

purified BSA (Promega). The later was used to stablish the background threshold of nonspecific binding of the antibody.

Proteins were dissolved in sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 700 mM β -mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.05% bromophenol blue), and loaded on a SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. After electrophoresis, proteins were transferred to PVDF membranes, blocked for 1 h at RT in a solution with 2% BSA in Tris-buffered saline-Tween (0.1%) (TBST), and immunolabeled overnight at 4°C with the following primary antibodies: rabbit CRB2 antibody (custom-made, 5 μ g/ml), mouse β -actin antibody (Sigma-AldrichTM, 1:5000), mouse GAPDH antibody (Sigma-AldrichTM, 1:10000), rabbit GFP antibody (Clontech, 1:1000), rabbit GST antibody (custom-made⁶¹, 0.5 μ g/ml), mouse PALS1 antibody (Abnova, 1:1000), mouse RPE65 antibody (AbcamTM, 1:5000) and mouse Synapsin antibody (Synaptic Systems, 1:1000) in a solution with 2% BSA in TBST. After several washes with TBST, the membranes were incubated with 1:5000 anti-rabbit IgG or 1:30000 anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (Jackson ImmunoResearchTM) in 2% BSA, 2% milk in TBST for 60 min at RT, washed with TBST, and developed with NBT (Nitro-blue-tetrazolium, Roche Applied ScienceTM) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Roche Applied ScienceTM) or incubated with 1:10000 anti-rabbit IgG, 1:10000 anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearchTM) or 1:10000 protein-A (Life TechnologiesTM) conjugated with horseradish peroxidase in 2% BSA and 2% milk in TBST for 60 min at RT, washed with TBST, and developed with PierceTM ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific).

We also carried out a peptide competition assay as a negative control. To accomplish this, the CRB2 antibody was incubated with 0.2 mg/ml of the corresponding original antigen fusion protein for 1 h at RT, and this mixture was used instead of the primary antibody dilution.

Immunofluorescence. To obtain RPE flatmounts, after the animals had been sacrificed their eyes were extracted and the lens and retinas were removed. Then, the RPE and choroid were fixed by immersion for 10 min in PFA 4%. Following this, the fixed tissue was washed in 0.2% PBS-Tx and blocked for 1 h in a solution with 1% BSA and 5% normal serum in 0.2% PBS-Tx and then incubated ON at 4°C in a solution containing 1% BSA and 2% normal serum in 0.2% PBS-Tx and the following primary antibodies: rabbit CRB2 antibody (custom-made, 5 μ g/ml), mouse PALS1 antibody (Abnova, 1:250), Phalloidin (Sigma-AldrichTM, 1:500), mouse p120 catenin antibody (BD Transduction Laboratories, 1:100), mouse RPE65 antibody (Abcam, 1:1000). Then, flatmounts were washed with 0.2% PBS-Tx and incubated for 1 h at RT with 1:500 Alexa fluor 488 and/or 1:500 Alexa fluor 555 fluorescent secondary antibodies (Life TechnologiesTM) and the nuclear-staining TOPRO-3 (Life TechnologiesTM, 1:1000) in 1% BSA and 5% normal serum in 0.2% PBS-Tx. Flatmounts were placed with the choroid facing the slide and the RPE facing the cover slip and mounted using ProlongTM Gold antifading reagent (Life TechnologiesTM).

Negative controls for the flatmounts immunolabeling were performed by removing the primary or secondary antibodies. We also carried out a peptide competition assay, as previously described in the WB analyses, to discriminate any possible background labeling.

Imaging. All images were obtained with a laser scanning spectral confocal microscope (Leica TCS SP2) with the pinhole set at 1.2 Airy Units and 40x and 63x immersion oil objectives. 488 nm, 543 nm and 633 nm laser lines were used to excite the Alexa 488, Alexa 555 and TOPRO3 fluorochromes respectively, and the three different channels were captured in sequential mode. Minor adjustments of contrast and brightness were performed with Adobe Photoshop CS5 software and Leica Confocal Software. For the 3D reconstructions, thirty-five optical sections were obtained with a voxel depth of 284.9 nm, covering a total depth of 8.8 μ m. The image stack obtained was then imported into ImageJ using the LOCI Bio-formats plug-in, and the 3D reconstruction was accomplished using the 3D viewer plug-in for Image J.

References

- Nelson, W. J. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766–774 (2003).
- Arimura, N. & Kaibuchi, K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* **8**, 194–205 (2007).
- Ellenbroek, S. I., Iden, S. & Collard, J. G. Cell polarity proteins and cancer. *Semin Cancer Biol* **22**, 208–215 (2012).
- Shen, L. Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann NY Acad Sci* **1258**, 9–18 (2012).
- Wang, Q. & Margolis, B. Apical junctional complexes and cell polarity. *Kidney Int* **72**, 1448–1458 (2007).
- Apodaca, G., Gallo, L. I. & Bryant, D. M. Role of membrane traffic in the generation of epithelial cell asymmetry. *Nat Cell Biol* **14**, 1235–1243 (2012).
- Assemat, E., Bazellieres, E., Palleis-Pocachard, E., Le Bivic, A. & Massey-Harroche, D. Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 614–630 (2008).
- Tepass, U., Theres, C. & Knust, E. crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of Drosophila epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* **61**, 787–799 (1990).
- Izaddoost, S., Nam, S. C., Bhat, M. A., Bellen, H. J. & Choi, K. W. Drosophila Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature* **416**, 178–183 (2002).
- Richard, M. *et al.* Towards understanding CRUMBS function in retinal dystrophies. *Hum Mol Genet* **15** Spec No 2, R235–243 (2006).
- Klebes, A. & Knust, E. A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in Drosophila. *Curr Biol* **10**, 76–85 (2000).
- Sotillos, S., Diaz-Meco, M. T., Caminero, E., Moscat, J. & Campuzano, S. DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in Drosophila. *J Cell Biol* **166**, 549–557 (2004).

13. Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. & Knust, E. Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature* **414**, 638–643 (2001).
14. Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L. Y. & Jan, Y. N. Drosophila Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature* **414**, 634–638 (2001).
15. Gosens, I., den Hollander, A. I., Cremers, F. P. & Roepman, R. Composition and function of the Crumbs protein complex in the mammalian retina. *Exp Eye Res* **86**, 713–726 (2008).
16. Bazellieres, E., Assemet, E., Arsanto, J. P., Le Bivic, A. & Massey-Harroche, D. Crumbs proteins in epithelial morphogenesis. *Front Biosci* **14**, 2149–2169 (2009).
17. Tepass, U. & Knust, E. Crumbs and stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **159**, 311–326 (1993).
18. Le Bivic, A. Why invent yet another protein complex to build junctions in epithelial cells? *Am J Physiol Cell Physiol* **305**, C1193–1201 (2013).
19. den Hollander, A. I. *et al.* CRB1 has a cytoplasmic domain that is functionally conserved between human and *Drosophila*. *Hum Mol Genet* **10**, 2767–2773 (2001).
20. Makarova, O., Roh, M. H., Liu, C. J., Laurinec, S. & Margolis, B. Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene* **302**, 21–29 (2003).
21. van den Hurk, J. A. *et al.* Characterization of the Crumbs homolog 2 (CRB2) gene and analysis of its role in retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Mol Vis* **11**, 263–273 (2005).
22. den Hollander, A. I. *et al.* Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet* **23**, 217–221 (1999).
23. Xiao, Z. *et al.* Deficiency in Crumbs homolog 2 (Crb2) affects gastrulation and results in embryonic lethality in mice. *Dev Dyn* **240**, 2646–2656 (2011).
24. Fogg, V. C., Liu, C. J. & Margolis, B. Multiple regions of Crumbs3 are required for tight junction formation in MCF10A cells. *J Cell Sci* **118**, 2859–2869 (2005).
25. Roh, M. H., Fan, S., Liu, C. J. & Margolis, B. The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Sci* **116**, 2895–2906 (2003).
26. Whiteman, E. L., Liu, C. J., Fearon, E. R. & Margolis, B. The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene* **27**, 3875–3879 (2008).
27. Fan, S. *et al.* A novel Crumbs3 isoform regulates cell division and ciliogenesis via importin beta interactions. *J Cell Biol* **178**, 387–398 (2007).
28. Sfakianos, J. *et al.* Par3 functions in the biogenesis of the primary cilium in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* **179**, 1133–1140 (2007).
29. Fan, S. *et al.* Polarity proteins control ciliogenesis via kinesin motor interactions. *Curr Biol* **14**, 1451–1461 (2004).
30. den Hollander, A. I. *et al.* Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. *Am J Hum Genet* **69**, 198–203 (2001).
31. den Hollander, A. I. *et al.* CRB1 mutation spectrum in inherited retinal dystrophies. *Hum Mutat* **24**, 355–369 (2004).
32. Alves, C. H. *et al.* Targeted ablation of Crb2 in photoreceptor cells induces retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* **23**, 3384–3401 (2014).
33. Alves, C. H. *et al.* Loss of CRB2 in the mouse retina mimics human retinitis pigmentosa due to mutations in the CRB1 gene. *Hum Mol Genet* **22**, 35–50 (2013).
34. Martin-Belmonte, F. & Perez-Moreno, M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 23–38 (2011).
35. Rizzolo, L. J., Peng, S., Luo, Y. & Xiao, W. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res* **30**, 296–323 (2011).
36. van de Pavert, S. A. *et al.* Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *J Cell Sci* **117**, 4169–4177 (2004).
37. Gosens, I. *et al.* FERM protein EPB41L5 is a novel member of the mammalian CRB-MPP5 polarity complex. *Exp Cell Res* **313**, 3959–3970 (2007).
38. Park, B. *et al.* PALS1 is essential for retinal pigment epithelium structure and neural retina stratification. *J Neurosci* **31**, 17230–17241 (2011).
39. Gosens, I. *et al.* MPP1 links the Usher protein network and the Crumbs protein complex in the retina. *Hum Mol Genet* **16**, 1993–2003 (2007).
40. Kim, S. *et al.* The apical complex couples cell fate and cell survival to cerebral cortical development. *Neuron* **66**, 69–84 (2010).
41. Mitsuishi, Y. *et al.* Human CRB2 inhibits gamma-secretase cleavage of amyloid precursor protein by binding to the presenilin complex. *J Biol Chem* **285**, 14920–14931 (2010).
42. Boroviak, T. & Rashbass, P. The apical polarity determinant Crumbs 2 is a novel regulator of ESC-derived neural progenitors. *Stem Cells* **29**, 193–205 (2011).
43. Pellissier, L. P. *et al.* CRB2 acts as a modifying factor of CRB1-related retinal dystrophies in mice. *Hum Mol Genet* **23**, 3759–3771 (2014).
44. Lemmers, C. *et al.* CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell* **15**, 1324–1333 (2004).
45. Strauss, O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* **85**, 845–881 (2005).
46. Marmorstein, A. D. The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic* **2**, 867–872 (2001).
47. Pardossi-Piquard, R. *et al.* Overexpression of human CRB1 or related isoforms, CRB2 and CRB3, does not regulate the human presenilin complex in culture cells. *Biochemistry* **46**, 13704–13710 (2007).
48. Alves, C. H. *et al.* Microarray and morphological analysis of early postnatal CRB2 mutant retinas on a pure C57BL/6J genetic background. *PLoS One* **8**, e82532 (2013).
49. van Rossum, A. G. *et al.* Pals1/Mpp5 is required for correct localization of Crb1 at the subapical region in polarized Muller glia cells. *Hum Mol Genet* **15**, 2659–2672 (2006).
50. Cho, S. H. *et al.* Genetic ablation of Pals1 in retinal progenitor cells models the retinal pathology of Leber congenital amaurosis. *Hum Mol Genet* **21**, 2663–2676 (2012).
51. Kantardzhieva, A. *et al.* MPP5 recruits MPP4 to the CRB1 complex in photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 2192–2201 (2005).
52. Roh, M. H. *et al.* The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol* **157**, 161–172 (2002).
53. Straight, S. W. *et al.* Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol Biol Cell* **15**, 1981–1990 (2004).
54. Lemmers, C. *et al.* hINAD1/PAT1, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J Biol Chem* **277**, 25408–25415 (2002).
55. Zou, J., Lathrop, K. L., Sun, M. & Wei, X. Intact retinal pigment epithelium maintained by Nok is essential for retinal epithelial polarity and cellular patterning in zebrafish. *J Neurosci* **28**, 13684–13695 (2008).

56. Harder, J. L., Whiteman, E. L., Pieczynski, J. N., Liu, C. J. & Margolis, B. Snail destabilizes cell surface Crumbs3a. *Traffic* 13, 1170–1185 (2012).
57. Roeth, J. F., Sawyer, J. K., Wilner, D. A. & Peifer, M. Rab11 helps maintain apical crumbs and adherens junctions in the *Drosophila* embryonic ectoderm. *PLoS One* 4, e7634 (2009).
58. Pocha, S. M., Wassmer, T., Niehage, C., Hoflack, B. & Knust, E. Retromer controls epithelial cell polarity by trafficking the apical determinant Crumbs. *Curr Biol* 21, 1111–1117 (2011).
59. Wiznerowicz, M. & Trono, D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 77, 8957–8961 (2003).
60. Sambrook, J. DWR. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
61. Arevalo, J. C. *et al.* Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron* 50, 549–559 (2006).

Acknowledgments

The authors thank Nicholas Skinner for revising the English version of the manuscript. This study was supported by grants from Fundación Ramón Areces and Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2008-04490/BFI). S.H.M received support from the Junta de Castilla y León PhD Program.

Author Contributions

A.E.P. designed the study, did the experiments, contributed to the data interpretation and to the writing of the manuscript, S.H.M., D.J. and A.M.J. participated in the data acquisition and imaging, J.C.A. and S.L.B. prepared the plasmids, A.V. and J.A. participated in the design of the study and C.L. directed the study, contributed to the data interpretation and to the writing of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Paniagua, A. E. *et al.* CRB2 completes a fully expressed Crumbs complex in the Retinal Pigment Epithelium. *Sci. Rep.* 5, 14504; doi: 10.1038/srep14504 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

2. The role of CRB2 in the RPE

English summary part 2

CRB2 finalizes the apicobasal polarization of retinal pigment epithelial cells by regulating tight junctions' maintenance and cell cycle arrest

Summary

Cell polarity is a key feature of many cell types that consists of an asymmetrical distribution of molecules, organelles and structures within the cell. This property is achieved by the coordination of three different protein complexes that interact to provide polarity to many cells and tissues. Epithelial cells show a special category of polarity named apicobasal polarity, where the cell's elements are distributed into two different faces or domains, and this differentiation process is essential for the development of their functions. In the present work, to better understand this highly regulated process, we have analyzed the role of the polarity protein CRB2 during the polarization of human Retinal Pigment Epithelial cells in vitro and on mature RPE cells in vivo. Here we demonstrate that this protein plays a key role in the maintenance of tight junctions as well as in cell cycle arrest, two of the main features of differentiated epithelia. Finally, in vivo knocking-down of CRB2 leads to the invasion of activated microglial cells into the subretinal space that supports the fact that CRB2 might be essential for the epithelial homeostasis.

Introduction

Cell polarity is a property of many cell types characterized by an asymmetrical distribution of molecules, organelles and structures within the cell, that leads to an asymmetry in the cell shape and, thus, of its functions¹. It is essential for the correct development of cellular processes like cell division, axon formation, transcellular transport of molecules or cell migration^{2, 3, 4}.

Epithelial cells are a specialized cell type covering many organs and tissues in the animals' body, serving, among others functions, as a protective barrier between the external environment and the living tissues. This function is done thanks to apicobasal polarity, that consists on the biochemical and morphological differentiation of an apical and a basal surface, which perform different functions and separate two environments⁵. Apicobasal polarity is achieved by the activity of three different protein complexes named Par, Crb, and Scrib that localize at the cell membrane and counteract in a stepwise way to provide this type of polarity to the epithelial cell^{6, 7}. The Par complex, composed by PAR3, PAR6 and aPKC proteins in mammals, is the first to be established at the cell membrane, and initiates the polarization process by determining the apical domain of the cell. It is followed by the arrangement of the Scrib complex, composed by the proteins

Scrib, Dlg and Lgl in mammals, that specifies the basal domain. Finally, the Crb complex, composed by CRB(1-3) isoforms, PALS1 and PATJ proteins in mammals, counteracts the Scrib function in the apical domain, establishing the apicobasal polarity⁸. This process takes place at the same time as the epithelial cell develops and polarizes some of its organelles and other components. One of the most relevant in the epithelial function is the establishment of the apical junctional complex⁵. In vertebrates, intercellular junctions includes adherens and tight junctions which, besides the adhesive role, are essential for processes like cytoskeleton arrangement, intracellular signaling and paracellular pathway sealing⁹. The apical polarity complexes Par and Crb integrate into these cell junctions during the establishment of the junctional complex and the polarization of the cell, being both processes highly interdependent¹⁰. In fact, Par complex is known to initiate adherens junctions formation and Crb complex is related to tight junctions establishment and maintenance^{5, 10}. Simultaneously to cell junctions formation and apicobasal polarization, epithelial cells proliferate to reach an optimal cell density and then progressively cease cell division, controlling the tissue size¹¹. It is generally known that cell junctions regulate epithelial differentiation and proliferation¹², and lately, defects in many polarity proteins have been related to the appearance of tumors because their failure lead to dysfunctions in cellular proliferation^{7, 11, 13}. Therefore, there is a strong relationship between apicobasal polarization, cell junctions formation and epithelial differentiation and, although many of the contributors of these processes are already known, some of them remain to be elucidated.

The Retinal Pigment Epithelium (RPE) is a monolayer of epithelial cells that faces the outer segment of photoreceptors in the retina. Most of its functions, like outer segment phagocytosis, visual pigments recycling, growth factors secretion, or transepithelial transport of molecules, are performed thanks to its apicobasal polarity, being essential for the visual process^{14, 15}. Therefore, the RPE plays a key role in controlling retinal homeostasis and thus, many of the visual impairments have their origin on this tissue¹⁶. As a polarized epithelium, the RPE expresses the three polarity protein complexes^{17, 18, 19, 20, 21, 22}, including CRB2, a member of the Crb complex whose expression and localization in this tissue has been recently described by our group²³. Despite the significance that polarity has in the RPE, very little is known about the role of these proteins in the RPE.

In the present work, we have analyzed the role of CRB2 during RPE differentiation. CRB2 is one of the three CRB isoforms expressed in mammals and all of them have been implicated in different developmental dysfunctions²⁴. CRB1 is well known for being implicated in retinal disorders in humans, and CRB2 defects cause similar conditions in mice^{25, 26}. CRB3 is the most studied CRB isoform, and it is known to regulate tight junctions formation and establishment, as well as epithelial cells' polarization^{27, 28, 29}. It is also known that both, CRB2 and CRB3 are essential for mouse

embryonic development^{30, 31, 32}. As previously noted, we have described for the first time the expression and location of CRB2 in the RPE²³, that to date, is the only CRB isoform detected in this cell type. However, nothing is known about its role in this tissue neither in other epithelial cells. In order to study that, we have developed and characterized a new model of normal human RPE (H-RPE) cell culture (Clonetics™ Human RPE Cells, LONZA). By using this model, we have analyzed the performance of the CRB2 protein under physiological conditions. Furthermore, to better understand its role during apicobasal polarization, we knocked-down its expression in these cells in vitro, as well as in the mouse RPE in vivo, by using two selective shRNAs for CRB2, resulting in that CRB2 controls some of the key features of the epithelial phenotype. These results provide the first to know observation of the role of CRB2 in an epithelial cell type.

Results

H-RPE cells in vitro fully differentiate within 21 days in culture (DIC). Recently, we have described in a previous work that CRB2 is located at the tight junctions of mature RPE in vivo²³. In order to study the role of CRB2 on polarizing RPE cells, we have set up and characterized a new culture model of normal human RPE (H-RPE) cells (Clonetics™ Human RPE Cells, LONZA), that is able to reproduce this process under controlled conditions.

Considering that differentiated epithelial cells turn into a quiescent state, our first aim was to evaluate the proliferative features of this cell culture. To do that we labeled cells with Ki67, a protein that is expressed in every step of the cell cycle except for G0³³. This way we observed that, after 7 days in culture, a 35% ($\bar{x}=37.37\% \pm 3.35$; $n=7$) of the cells were in a proliferative Ki67⁺ state (**Figure 1A,D**). The number of proliferating cells significantly decreased to 20% ($\bar{x}=21.18\% \pm 4.21$; $n=6$) ($p=0.012$; $n=13$) at 14 DIC (**Figure 1A,E**), and to almost 0% ($\bar{x}=0.64\% \pm 0.55$; $n=4$) ($p=0.006$; $n=10$) at 21 DIC (**Figure 1A,F**), when the cell culture reached an optimal cell density and thus differentiated.

In order to determine the cell density during this period, we quantified the cell nuclei by immunofluorescence. Our results show that cell density increased from the initially seeded 50,000 cells/cm² to 100,000 cells/cm² ($\bar{x}=113,232 \pm 9,885$; $n=6$) at 7 DIC (**Figure 1B,D**), to 250,000 cells/cm² ($\bar{x}=241,538 \pm 62,009$; $n=5$) at 14 DIC (**Figure 1B,E**), reaching approximately 300,000 cells/cm² ($\bar{x}=308,086 \pm 68,544$; $n=3$) at 21 DIC (**Figure 1B,F**). Therefore, from 7 to 21 DIC there is a significant increase in cell density ($p=0.049$; $n=9$). If we consider the percentage of cell population doubling between these periods we observe that there is an increase of about 120 % ($\bar{x}=126.46\% \pm 11.04$; $n=6$) from 0 to 7 DIC, of about 110 % ($\bar{x}=113.31\% \pm 29.09$; $n=5$) from 7 to 14 DIC and about 25 % ($\bar{x}=27.55\% \pm 6.13$; $n=3$) from 14 to 21 DIC.

Therefore, we can consider that H-RPE cells in culture proliferate up to achieve an optimal cell density of about 300,000 cells and then cease cell division.

H-RPE cells in culture fully polarize within 21 days in culture. We then studied how these cells acquire the known polarity features during 21 days of culture. To do that, we first analyzed the distribution of actin filaments, as the formation of the actin belt which surrounds the epithelial cell membrane, is one of the first signs of polarization in epithelial cells³⁴. F-actin filaments labeling shown that at 7 DIC, most of them are crossing the cytoplasm of the cells in a disorganized way (**Figure 1G**). At 14 DIC, although some of them are still crossing the cytoplasm, most of them are close to the cell membrane (**Figure 1H**), showing the typical polyhedral epithelial shape. Finally, at 21 DIC the epithelial shape is perfectly defined by the actin belt that entirely surrounds the plasma membrane (**Figure 1I**), showing a classical morphological feature of polarized epithelial cells.

In order to evaluate the polarity degree acquired by the cells during this period, we studied their ultrastructure by electron microscopy. We first measured the cells' height, as epithelial cells grow by the extension of its apical membrane as they polarize¹³. This way we observed that RPE cells are 5 μm height ($\bar{X}=5.46 \pm 0.34$, $n=15$) at 7 DIC (**Figure 1J**), that significantly increase to 7 μm ($\bar{X}=7.35 \pm 0.30$, $n=15$) ($p=0.000$; $n=30$) at 14 DIC (**Figure 1K**), and to 10 μm ($\bar{X}=9.90 \pm 0.15$, $n=62$) ($p=0.004$; $n=77$) at 21 DIC (**Figure 1L**). Therefore, there is a highly significant increase in the cell height from 7 to 21 DIC ($p=0.000$; $n=77$), which is another morphological sign of the gradual polarization process of the RPE cells.

Bearing this in mind, we analyzed the localization of organelles and other elements within the cells, one of the main features of the acquisition of cell polarity, observing progressive changes in the organelles' localization as well as the development of certain structures during the 21 days of the culture. This way, we noticed that at 7 DIC the nuclei present a fusiform morphology, typical of the undifferentiated epithelial cells, and occupy most of the cytoplasm (**Asterisk in Figure 1J**). Moreover, at this time cells do not present any polarized distribution of organelles or structures (**Figure 1J**) so at 7 DIC, H-RPE cells remain depolarized. However, at 14 DIC cells begin to exhibit some polarity signs like the basal location of the nuclei, although still show a flat shape (**Asterisk in Figure 1K**), and a basal labyrinth (**Arrowheads in Figure 1K**), and develop microvilli at the apical domain (**Arrows in Figure 1K**). These polarized structures are not only maintained but developed up to 21 DIC. Microvilli at the apical surface became longer (**Arrows in Figure 1L**), and nuclei, that acquired a rounded morphology typical of cubical epithelial cells, localize at the basal side (**Asterisk in Figure 1L**) together with mitochondria (**Arrowheads in Figure 1L**). All of these are signs of apicobasal polarity.

Therefore, we can conclude that H-RPE cells progressively develop apicobasal polarity features, reaching a fully polarized state after 21 DIC.

H-RPE cells in culture progressively develop a junctional complex that seals the paracellular transport. One of the main functions of fully differentiated epithelia is the capacity to minimize the paracellular flow of ion, triggered by the establishment of adherens and tight junctions at the apicolateral membrane⁵. In order to study this characteristic, we first measured the resistance of the cells to the passage of an electrical current among the two chambers of the Transwell, known as Transepithelial Electrical Resistance (TER). This is a well established method to indirectly measure the strength of the epithelial junctional complexes. This way we realized that TER significantly increases from about 20 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\bar{x}=21.02 \pm 0.98$, n=32) at 7 DIC to about 35 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\bar{x}=34.91 \pm 1.39$, n=24) ($p=0.000$; n=56) at 14 DIC. From then, the TER highly significantly increases to about 90 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ($\bar{x}=90.60 \pm 7.76$, n=18) ($p=0.004$; n=42) at 21 DIC (**Figure 2A**). These data indicate that cells are progressively minimizing the paracellular ion flow, especially from 14 to 21 DIC, indicating the establishment of consistent cell-cell junctions. To study this possibility we analyzed the expression and localization of the adherens junction protein β -catenin, and the tight junctions protein Occludin by Western blot and immunofluorescence assays. This way we observed that β -catenin is expressed from 7 DIC on with a slight increase in the protein levels throughout time. Occludin however, is expressed from 14 DIC on, maintaining constant protein levels up to 21DIC (**Figure 2B**). The immunofluorescence analysis demonstrated that β -catenin is located at the cell membrane from 7 DIC on and progressively outlines the entire cell membrane as the polyhedral shape appears (**Figure 2C-E**). Occludin localizes at the cell membrane from 14 DIC on. Although Occludin labeling at 7 DIC stains the nuclei of the cells, which is persistent in some of them at 14 DIC, it corresponds to non-specific labeling, since the Western blot results show that there is no Occludin expression at 7 DIC, beginning at 14 DIC, at the time point that Occludin starts to be located at the cell membrane (**Figure 2F-H**). We finally confirmed these observations with the ultrastructural analysis of the apicolateral membrane of the H-RPE cells at the different time points. This way we also demonstrated that, at 7DIC the cells only show adherens junctions (**Arrows in Figure 2I**) but not tight junctions at the apicolateral cell membrane. At 14 DIC however, we found adherens (**Arrows in Figure 2J**) as well as tight junctions located apically to these, (**Arrowheads in Figure 2J**) at the apicolateral membrane. Finally, at 21 DIC there are adherens (**Arrows in Figure 2K**) and tight junctions completely developed (**Arrowheads in Figure 2K**), that effectively sealed the paracellular transport.

In summary, H-RPE cultures gradually differentiate and polarize along 21 DIC, presenting most of the characteristics of mature epithelia.

The proteins of the apical polarity complex are expressed and localized at the cell membrane at different time points during cell polarization. Once we had characterized the differentiation and polarization process of the H-RPE cells in culture, we aimed to clarify the occurrence of the apical polarity complexes, Par and Crb, during this process. To do that, we investigated the expression and localization of the Par complex proteins PAR3 and aPKC and the Crb complex proteins PATJ, PALS1 and CRB2. This way we first observed by Western blot that PAR3 is expressed from 7 DIC on, in contrast to CRB2 and PALS1 expression that begins at 14 DIC and hereafter maintained (**Figure S1**). Regarding their subcellular distribution, we observed that PAR3 and aPKC, from the Par complex, localize at the cell membrane from 7 DIC to 21 DIC, progressively delineating the polyhedral epithelial morphology (**Figure 3A-F**). On the contrary, every Crb complex protein analyzed showed a different performance during the time course of the cell culture. At 7 DIC, we found expression of PATJ, but not that of PALS1 (**Figure 3J**) or CRB2 (**Figure 3M**). At this early time point, PATJ is located at the cytoplasm forming tangled-like structures (**Figure 3G**). At 14 DIC, in consonance with the Western blot results, PALS1 and CRB2 are present in the cell cultures, but only PALS1 localizes at the plasma membrane (**Figure 3K**) together with PATJ (**Figure 3H**). At this time point, CRB2 (**Figure 3N**) and some PATJ tangles remain in the cytoplasm (**Figure 3H**). Finally, at 21 DIC, CRB2 localizes at the plasma membrane (**Figure 3O**), together with PATJ (**Figure 3I**) and PALS1 (**Figure 3L**), completing the Crb complex formation.

Therefore, while Par complex is established at the plasma membrane from the early stages of the polarization process, the proteins of the Crb complex show a different expression time course and subcellular distribution patterns. In general, their expression begin at a middle stage, from day 14 DIC onwards and finishes with the arrival of CRB2 at the plasma membrane, at the latest stage of the polarization process.

CRB2 controls tight junctions and Crb complex maintenance, and cell cycle arrest. In order to investigate the precise role of CRB2 during the polarization and differentiation of H-RPE cells in culture, we performed silencing experiments using two different shRNAs (shCRB2#1 and shCRB2#2), comparing the results with those obtained using a control shRNA (shCTR).

Although cells were infected with the lentivirus containing the shRNA sequences in appropriate plasmids from the first day in culture, we analyzed the effects of knocking-down CRB2 from 14 DIC onwards, when we have detected the first signs of its expression. Both shCRB2#1 and shCRB2#2 effectively knocked down CRB2 at 14 DIC as shown by Western blot analysis (**Figure 4A**). CRB2 silencing does not modify β -

catenin, Occludin, PAR3 and PALS1 protein levels (**Figure 4A**) and neither affects cell proliferation (**Figure 4B**), cell density (**Figure 4C**) nor TER (**Figure 4D**) at 14 DIC. In spite of this, we further analyzed the location of β -catenin (**Figure S2A**), PAR3 (**Figure S2B**), Occludin (**Figure 4E**) and PALS1 (**Figure 4F**) in CRB2 knocked-down cells, that can be identified by the GFP fluorescence tag, to try to elucidate whether there was alterations in their distribution due to the lack of CRB2, but none of them showed any modification when compared with the shCTR infected cells.

Although there were no modifications at 14 DIC, we ought to investigate whether there could be some alterations after a sustained time period in the absence of CRB2, so we then analyzed the effects of CRB2 knockdown at day 21, when this protein should localize at the plasma membrane. This way we observed that both shCRB2#1 and shCRB2#2 effectively knocked down CRB2 at 21 DIC (**Figure 5A**). Interestingly, we detected that CRB2 silencing significantly increase the number of proliferating cells of about 2,5 times with shCRB2#1 ($\bar{X}=2,54 \pm 0,84$, $n=10$) ($p=0,015$; $n=20$) and about 2 times shCRB2#2 ($\bar{X}=1,86 \pm 0,28$, $n=10$) ($p=0.013$; $n=20$) when compared with the normalized data of shCTR cell cultures ($\bar{X}=1,00 \pm 0,14$, $n=10$), but not between both shCRB2 ($p=0,959$; $n=20$) (**Figure 5B**). However, our results show that CRB2 silencing does not alter the protein levels of β -catenin, Occludin, PAR3 and PALS1 neither at this time (**Figure 5A**) and does not affect cell density (**Figure 5C**), nor TER (**Figure 5D**). Nevertheless, when comparing the subcellular location of proteins of cell junctions and apical polarity complexes we found that, while β -catenin (**Figure S2C**) and PAR3 (**Figure S2D**) were correctly located at the plasma membrane in both shCTR and shCRB2 infected cells, Occludin (**Figure 5E**) and PALS1 (**Figure 5F**) distribution was altered in CRB2 knockdown cells when compared to control. More precisely, Occludin clearly disappeared from the cell membrane of confluent shCRB2 infected cells when compared with those infected with shCTR, where this protein was properly located (**Arrowheads in Figure 5E**). PALS1 however, show a continuous labeling of the plasma membrane in shCTR infected cells, but a scarce and dotted pattern in those infected with shCRB2#1 and shCRB2#2 (**Arrowheads in Figure 5F**).

We can therefore conclude that the arrival of CRB2 at the cell membrane controls tight junction proteins, Occludin, and Crb complex protein PALS1 maintenance but not their establishment at the cell membrane. However CRB2 does not control nor the establishment or the maintenance of the adherens junction protein β -catenin and the Par complex protein PAR3. Finally, the establishment of CRB2 at the plasma membrane affects cell cycle arrest in differentiated epithelial cells.

In vivo CRB2 knockdown in the RPE causes molecular and morphological alterations in this cell type and subretinal homeostasis imbalance. It has been

described that the changes observed in different types of cells when Crb complex proteins are altered in vitro turn into serious disorders when they occur in vivo^{22, 25, 26, 31}. Therefore, we next aimed to elucidate the consequences of knocking-down CRB2 in the RPE in vivo. To do that, we injected lentiviral vectors, containing a GFP tag and either a shRNA against Crb2 (shCRB2), that had been previously validated²³ or a shRNA control (shCTR) at the subretinal space of mice of 21 days of age. The effects of Crb2 knock down were analyzed 60 days after the injection (DAI).

We first analyzed the infection efficiency by quantifying the area containing GFP⁺ cells on RPE Flat Mounts in relation to the total area. Our results showed that approximately 10 % of the RPE extension was infected ($\bar{x}=9.62 \pm 1.80$, $n=15$), and there were not significant differences between the infected area with the shCTR or the shCRB2 ($p=0.203$; $n=15$) (**Figure 5A**). We then demonstrated that lentiviral vectors were exclusively infecting RPE cells (**Figure 5B, C and Arrowhead in C'**), not the neural retina (**Arrow in Figure 5C'**), by discriminating RPE cells when labeling them with RPE65, a specific marker for RPE cells. This way, this technique allows us to study the consequences of the in vivo depletion of CRB2 specifically in the RPE cells.

In order to investigate the effects of knocking-down CRB2 in RPE cells in vivo, we first analyzed the general conditions of the cell junctions by labeling the ZO-1 protein. Even though we did not find any alteration in the ZO-1 labeling at the plasma membrane in the shCTR (**Figure 6D**) or the shCRB2 (**Figure 6D'**) GFP⁺ infected cells, we did find morphological modifications when CRB2 was knockdown. We noticed that the shCTR infected cells maintain the epithelial polyhedral shape (**Asterisk in Figure 6D**), but those infected with shCRB2 shown abnormal curved faces (**Asterisk in Figure 6D'**). We then analyzed the performance of the apical polarity complexes. This way we observed that PAR3 presents a continuous staining at the plasma membrane of the shCTR infected cells (**Arrowhead in Figure 6E**). Nevertheless, in the shCRB2 infected cells, PAR3 showed a discontinuous and dotted distribution not only the plasma membrane (**Arrowhead in Figure 6E'**) but also the cytoplasm (**Arrow in Fig 6E'**). PALS1 is also affected, since the labeling for this protein delineated the whole profile of the plasma membrane in the shCTR infected cells (**Arrowheads in Figure 6F**), while in those infected with shCRB2, the labeling for PALS1 in the plasma membrane is remarkably disrupted (**Arrowheads in Fig 6F'**). We therefore conclude that knocking-down CRB2 in RPE cells leads to morphological alterations and molecular modifications of PAR3 and PALS1 localization.

We then aimed to evaluate whether the molecular changes caused by a defective CRB2 expression in the RPE cells affects the maintenance of the retinal homeostasis. In order to clarify this issue, we analyzed the presence and performance of microglial cells at the subretinal space, a characteristic behavior of this cell type during aging and retinal

damage³⁵. To do so, we labeled microglial cells with the specific marker Iba1 in RPE Flat Mounts and quantified the number of cells, differentiating between the amoeboid, phagocytic (**Arrowhead in Figure 6G**), and the ramified, non phagocytic (**Arrowhead in Figure 6G**) phenotypes. As expected, shCTR infected Flat Mounts present a substantial number of microglial cells at the subretinal space ($\bar{X}=343.17 \pm 105.78$; $n=6$), as the injection procedure causes a severe mechanical damage, but this number is significantly higher in shCRB2 infected Flat Mounts ($\bar{X}=761.17 \pm 54.07$; $n=6$) ($p=0.003$; $n=12$) (**Figure 6H**). However, this increase is not due to ramified microglial cells, which number is similar in shCTR ($\bar{X}=293.83 \pm 94.46$; $n=6$) and shCRB2 ($\bar{X}=314.50 \pm 56.42$; $n=6$) ($p=0.855$; $n=12$) infected Flat Mounts (**Figure 6H**), but because of the amount of amoeboid cells, which is significantly higher in shCRB2 ($\bar{X}=446.67 \pm 146.36$; $n=6$) compared to shCTR ($\bar{X}=49.33 \pm 33.66$; $n=6$) ($p=0.001$; $n=12$) infected Flat Mounts (**Figure 6H**). Cells of both phenotypes are equally distributed along the subretinal space (**Figure S3**), although there is a slight higher concentration, especially of the amoeboid phenotype cells, at the injection site (**Yellow circles in Figure S3**).

Finally, we aimed to determine if the subretinal homeostasis disturbance was only originated by the RPE dysfunction or if the neural retina was also affected at this time. To do so, we analyzed some proteins and structures that conventionally happen to be affected when the retinal homeostasis is altered, as overexpression of GFAP in Müller cells³⁶ or synapses and photoreceptors outer segments disorganization³⁷. This way we observed that there were no alterations in the levels of GFAP, arrangement and regular pattern of rhodopsin in the rods outer segments, nor synapses protein synaptotagmin (**Figure S4**). The immunofluorescent analyses to show the expression of these proteins in retinal sections adjacent to the injection area demonstrated that there are no differences in the GFAP expression, mostly present in some Müller processes coming from the inner limiting membrane (**Arrows in Figure 7A and A'**) throughout the inner retina (**Arrowheads in Figure 7A and A'**) in both experimental groups. There are no differences either in the structure of the cone outer segment (**Arrowheads in Figure 7B and B'**) or the cones' synaptic pedicles (**Arrows in Figure 7B and B'**) labeled with PNA, neither in the morphology of the synapses located in the outer plexiform layer (**Arrowheads in Figure 7C and C'**) nor the inner plexiform layer (**Arrows in Figure 7C and C'**) labeled with Bassoon.

These results indicate that knocking-down CRB2 in the RPE cells have an effect on the subretinal homeostasis maintenance, causing a massive arrival of phagocytic amoeboid microglial cells to the subretinal space, but not to the neural retina, that maintains its usual lamination and typical structures at 60 DAI.

Discussion

Although most of the proteins that take part of the Crb complex, as CRB3, PALS1 and PATJ are known to play a key role in apicobasal polarity and tight junctions establishment in epithelial cells^{28, 29, 38, 39}, nothing is known about the precise role of CRB2 on this cell type. In a recent work, we demonstrated its expression in the RPE²³, a polarized epithelial monolayer adjacent to the retina that participates in the visual cycle and retinal homeostasis maintenance¹⁴. CRB2 is essential for the proper embryonic development of the mouse³⁰, for the development of the retina^{25, 40}, and for neural differentiation⁴¹. Therefore, as it has already been demonstrated for PALS1²², another member of the Crb polarity complex, CRB2 could also be very important for the homeostasis of these cells, so we have investigated its role during polarization, differentiation and maturity of the RPE.

H-RPE cell culture: a new model to study the biology of polarized retinal pigment epithelial cells. In order to study the role of CRB2 in the RPE, we have set up and characterized a new culture model of normal human RPE (H-RPE) cells (Clonetics™ Human RPE Cells, LONZA) that under controlled conditions, fully polarize and differentiate, and also express CRB2 that localizes at the plasma membrane. H-RPE cells in culture show polarized structures as microvilli and a junction belt at the apical side or the basal labyrinth, the nucleus and the mitochondria at the basal face, similar to the regular circumstances of the epithelial cells in vivo⁴². Simultaneously, these cells progressively differentiate and develop physiological epithelial features, like the sealing of the paracellular ion flow by the formation of a mature junctional complex, resembling the epithelial phenotype^{12, 43, 44}. In summary, they gather the main advantages of other epithelial cell cultures: 1- H-RPE cells are able to fully polarize and differentiate as an in vivo epithelium does, something only shown by certain cell types like human embryonic stem cells differentiated into RPE cells⁴⁵ or MDCK cells⁴⁶, and not by other models commonly employed for the study of the RPE biology, such as the ARPE-19 cells; 2- They are from human origin, something important for the study of human diseases; 3- They are commercially available, what makes their acquisition easier; 4- They are easily cultured, since they just require one type of medium. On the contrary, they show some disadvantages: 1- They are not an immortalized cell line, so they cannot be used after several passages, as they do not maintain the phenotype; 2- The composition of the culture medium is unknown, as it is preserved under trade secret, so experiments related to the chemistry of the medium are more difficult to control; 3- They require 21 days to polarize and differentiate, a more extensive period of time compared to similar epithelial culture models that require about a week³⁸, but this allows an more detailed study of every step that take place on these processes.

Therefore, the H-RPE cells culture is a new model of cultured epithelial cells that show mature epithelial phenotype features that can be employed to study, not only the biology of the RPE, but also of epithelial cells in general.

The expression and location of the apical polarity complexes proteins vary with the polarization degree of the epithelial cell. It is well known that apicobasal polarization is a highly coordinated process leaded by the three polarity complexes⁶. In this work, we have proven that Par complex proteins PAR3 and aPKC are the first ones to be expressed and localized at the plasma membrane, even when the cells show a low polarity degree, the adherens but not tight junctions are being established as occurs in *Drosophila melanogaster* model^{47, 48, 49}, and many of the cells are in a proliferative state. We have noticed that PATJ is also expressed at this time, but localizes at the cytoplasm, so it is not being part of the Crb complex at this moment, with a distribution resembling that of the cytoskeletal components. The organization of the cytoskeleton during apicobasal polarization has been extensively studied^{34, 50}, but little is known about the involvement of the polarity proteins during this process. The most direct relationship has been found in the Par complex, as aPKC and its activators, Cdc42 and Rac1, have been related to cytoskeletal changes^{51, 52}, although the molecular mechanism that lead to this effect is not still well understood. Interestingly, aPKC localizes at the area where cytoskeleton is being reorganized thanks, at least, to PATJ⁵³, that is also able to form a complex with the Cdc42 activator, Rich1⁵⁴. Therefore, all these data suggest that PATJ could interconnect aPKC and the cytoskeleton during apicobasal polarization although no direct binding sites between these two proteins have been found to date, and more experiments are needed to confirm this hypothesis. Next, when tight junctions are established and the epithelial cell shows some degree of apicobasal polarity, the Crb complex proteins PALS1 and CRB2 begin to be expressed. However, only PALS1 localizes at the plasma membrane, together with PATJ, that progressively changes its localization, while CRB2 remains at the cytosol. These results open the debate of which protein, if only one, triggers the establishment of the Crb complex at the plasma membrane. CRB proteins have been suggested to initiate this establishment as they are the only proteins of the Crb complex that present a transmembrane domain²⁴. Our results question this hypothesis as CRB2 localizes at the plasma membrane once PALS1 and PATJ have been positioned in this location. However, we cannot discard that another CRB isoform, for example CRB3, whose mRNA is expressed in the RPE²³ and that is able to initiate tight junctions formation in cells that do not usually form it²⁷, can perform this role for CRB2. On the contrary, PATJ and PALS1 can form a complex at the plasma membrane without CRB3 that it is known to remain at the cytoplasm during cell migration⁵³, and PATJ is also able to directly bind tight junctions proteins like ZO-3 or Claudin-1 at the plasma membrane^{55, 56}, so it is also possible that a different protein than a CRB isoform might initiate the Crb complex formation. PATJ and PALS1 have a highly dependent relationship that affects the expression and location of both of them^{38, 57}. PALS1 stabilizes PATJ levels by preventing its degradation⁵⁸, so it is possible that the location of PALS1 at the plasma membrane triggers the stabilization of the cytosolic PATJ at this place.

Finally, CRB2 is the last of the Crb complex proteins to localize at the plasma membrane, and this happens when cells show the highest polarity degree and most of them are no longer proliferating. Therefore, one of the conclusions is that CRB2 localizes at the plasma membrane of already mature polarized epithelial cells.

The location of CRB2 at the plasma membrane participates in tight junction maintenance and cell cycle arrest. The lack of CRB2 *in vivo* lead to severe alterations of the homeostasis during development and also in adulthood^{125, 30, 59, 60}. However, to our knowledge, this is the first study describing the role of CRB2 during the entire apicobasal polarization performed in epithelial cells *in vitro*. We have demonstrated that knocking-down CRB2 does not alter the expression levels of β -catenin, Occludin, PAR3 and PALS1, similar to what occurs when other Crb complex proteins are silenced in similar models^{38, 57, 61, 62}. Interestingly, all the effects of the CRB2 knockdown observed happen when this protein performs its functions right at the plasma membrane with the other Crb complex members, but not when it was located at the cytosol. The absence of any alterations might be explained by the fact that CRB3, another member of the CRB protein family, whose mRNA we have described to be present in RPE cells, has been previously related to tight junctions formation while Crb complex establishment in other epithelial cells^{27, 31, 32}, so it might be implicated in this same process in the RPE cells, although this has not been explored yet. This opens the question about the role that CRB2 plays, if any, when the cell is not already fully polarized and CRB2 is not being a functional part of the Crb complex at the plasma membrane. The Crb3 gene can generate two different isoforms by alternative splicing that differ in the C-terminal sequence ending. One of these CRB3 isoforms named CRB3B presents a cytoplasmic location where it regulates cytokinesis⁶³. CRB2 mRNA can also undergo alternative splicing that generate secretable proteins⁶⁴, but to date, there have not been described alternative splicing that could generate a similar isoform to that of CRB3B. Furthermore, CRB3B knockdown generate multinucleated epithelial cells⁶³, something that we have not found in our experimental model, so the cytoplasmic location of CRB2 does not seem to be related with similar processes as those described for CRB3B. Interestingly, it has been described that the protein p60 AmotL2 retains CRB3 at the cytosol when epithelial cells lose their polarity because of the inhibition of its transport by the TRAPP II (Transport Protein Particle II) complex, that regulates the transport of vesicles from the Golgi apparatus to the plasma membrane in polarized cells⁶⁵. Therefore, we consider that it is more plausible that the location of CRB2 at the cytosol is a result of a similar regulation process.

One of the main known functions of the Crb complex is its role in tight junctions formation and maintenance^{24, 66}. However, our results complete this statement, as we have seen that tight junctions are able to form without CRB2, but they are not properly

maintained if CRB2 does not reach at the plasma membrane. This role has been usually studied when employing cells lacking some of the proteins of the Crb complex, and forced to reestablish the cell junctions when performing a Calcium Switch Assay, that completely disorganize the cell-cell junctions, but it has not been shown during the normal development of the culture, since cells are able to form the cell junctions under regular culture condition^{28, 29, 38, 39, 67}. This could mean that CRB2 have a more important role than the other Crb complex proteins in tight junctions maintenance or that the H-RPE cells are a more accurate model to study this process. Interestingly, we have observed that when CRB2 is defective, Occludin and PALS1 disassemble from the plasma membrane, but not β -catenin nor PAR3, something relevant because the lack of CRB2 in the mouse neural retina in vivo leads to, besides PALS1 and ZO-1, the disassembly of adherens junctions and Par complex^{25, 40}. Therefore, the cell junctions disruption could specifically start with the dismantling of tight junctions and Crb complex proteins and progressively extends to that of the adherens junctions and Par complex proteins. It is important to point out that PALS1 location is not completely disrupted, so it is possible that some proteins of the PALS1 pool still take part of the Crb complex at the plasma membrane, maybe with another CRB isoform as CRB3. Further experiments are needed to clarify these proposals.

Secondly, CRB2 knockdown causes a significant cellular proliferation increase at the time point when it should reach the plasma membrane. Although the total number of proliferating cells is not very high, it could be important if happens in vivo, as epithelial cells are the origin of most of the human tumors¹¹. In fact, many of the polarity proteins have been discovered as tumor suppressors or have been later related with the origin or malignancy of different tumors^{8, 68, 69, 70}. CRB2 is also involved in a proliferation increase during differentiation of neural cells^{25, 41}, but this is the first time that it is related to this process in epithelial cells. However, the mechanism by which CRB2 regulates cell cycle arrest remains unknown. Recent studies have related the Crb complex with Notch^{71, 72, 73} and Hippo^{74, 75} signaling pathways, that are directly involved in cell division and differentiation in several cell types during development and in tissue size control^{76, 77}. Interestingly, the CRB2 KO mouse, although its lethality during the embryonic development, forms bigger structures and organs than wild type³⁰, which, together with our results and those from others studies, reinforce the possibility that CRB2 might have a role in both signaling pathways.

CRB2 is essential for the maintenance of the RPE cell's homeostasis. Finally, we have proved that CRB2 also plays an essential role in the RPE cells stability in vivo. CRB2 knockdown causes not only the loss of the polyhedral morphology of RPE cells, something similar to the effects of knocking-down PALS1 in this tissue²², but also the disruption of PALS1 and PAR3 from the plasma membrane, but not of ZO-1. These

of others, and as it has been already mentioned, the lack of any of the Crb complex proteins in the neural retina leads to the disassembly of not only the polarity complex proteins but also of the cell junctions of the outer limiting membrane^{21, 25, 40, 78, 79, 80}. However, CRB2 and CRB3 silencing during the mouse embryo development have shown that the lack of these proteins leads to the polarity proteins disassembly on the epithelial tissue, but never affects the cells' junctions^{30, 31, 32}. Therefore, it is possible that the Crb complex play roles of different relevance in the different tissues where it is expressed. Despite these alterations, we have not been able to detect an increase neither in apoptosis, nor in proliferation (data not shown), as it has been found when silencing CRB2 and PALS1 in vivo in neural tissues^{25, 81}. Therefore, these alterations could be dependent on the affected tissue, or on the time period occurred after knocking-down CRB2. We have not observed any substantial or striking alteration in the neural retina, but a significant increase in activated phagocytic microglial cells at the subretinal space has been described, that could be explained by the fact that CRB2 knockdown in the RPE cells might affect to the homeostasis maintenance at this location. So, it is probable that a sustained knockdown of CRB2 finally leads to a disruption of the entire junctional complex, and not only to tight junctions and Crb complex. More detailed studies are needed to know how the retina is affected by the general and sustained lack of CRB2 in the RPE cells.

We consider that these results are of interest because we have demonstrated that CRB2 is essential for some of the main features of RPE cells in vivo and in vitro. The RPE is a fundamental tissue that maintains retinal homeostasis, among other functions, so many retinal pathologies have their origin on its failure¹⁶. The role of CRB2 should be taking into account for future studies related not only with the biology of the RPE cells, but also of other polarized cell types.

Experimental procedures

All procedures used in this work were in accordance with the guidelines of the European Communities Council Directive 2010/63/UE and the RD 53/2013 Spanish legislation for the use and care of animals. All the details of the study were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca.

Plasmid and lentiviral particles generation. Four shRNAs sequences indicated in the Table S1 were cloned into pLVTHM vector (addgene), and 20 µg of pLVTHM containing the specific shRNA together with 15 µg of psPAX2 and 6 µg of pMD.2G were co-transfected into confluent HEK293FT following the calcium phosphate precipitation assay⁸². The culture medium (DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% MEM Non-Essential Amino Acids, 1% penicillin/streptomycin and

1% sodium pyruvate) was replaced 8 h after transfection, and 48 h after the supernatant containing the lentiviruses was collected, centrifuged at 4700 g for 10 min, filtered with a 0.22 μ m pore PVDF membrane and stored at -80 °C. The supernatants destined for subretinal injections were ultracentrifugated at 121,500 g for 2h at 4 °C, dissolved in PBS and stored at -80 °C.

H-RPE cell culture and infection. Clonetics™ Human RPE cells (LONZA) were seeded in the fourth passage at 50000 cells/cm² in polyester Transwell® of 4 μ m pore size (Costar®) and maintained in RtEBM™ - Retinal Pigment Epithelial Cell Basal Medium (LONZA) supplemented with L-Glutamine (4mM), bFGF (5 ng/ml), Gentamicin (30 μ g/ml), Amphotericin (15 ng/ml) and 2 % of fetal bovine serum (FBS) up to three days after seeding and without FBS thereafter. The medium was replaced every three to four days. For silencing experiments, 16,500 H-RPE cells were infected with 20 μ l of supernatant containing lentiviruses the first day of culture and removed three days later.

Animals handling and subretinal injections. Postnatal 21 day C57BL/6J mice were anesthetized with 2.0 isoflurane (Forane®) inhalation and the pupils were dilated with a solution containing 1 % (w/v) atropine sulfate and 2.5 % phenylephrine. A drop of the local anesthetic 0.5 % proparacaine hydrochloride was also administered to the eye. After three minutes, a sclerotomy of the temporal limbus was performed with a 30-G needle, and 1 μ l of the solution containing the lentivirus was injected at the subretinal space at a speed of 150 nl/s with a 33-G needle attached to a NanoFil 100 μ L syringe (World Precision Instruments, Inc) and controlled by an UltraMicroPump III system (World Precision Instruments, Inc). 60 days later mice have been euthanized with carbon dioxide prior to tissue extraction.

Transepithelial Electrical Resistance (TER). TER, expressed in Ω ·cm², was measured with an EVOM2 voltohmmeter and STX2 electrodes (World Precision Instruments) that were submerged to each camera of the transwell and calculated by subtracting the background of a blank and multiplying the resulting measurement by the surface area of the filter where cells were cultured.

Protein extraction and Western blot. After the animals' euthanasia, the eyes were dissected out, the cornea and lens removed and the retina extracted. H-RPE cells and retinas were lysed in RIPA buffer (150 mM sodium chloride 1.0% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate, 50 mM Tris, pH 8.0) with protease inhibitor cocktail (1:1000, Sigma-Aldrich™) and Laemmli buffer (2% SDS, 10% glycerol, 700 mM β -mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.05% bromophenol blue) and loaded on a SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. After electrophoresis,

proteins were transferred to PVDF membranes, blocked for 1h at RT in a solution with 2% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline-Tween (0.1%) (TBST), and immunolabeled overnight at 4°C with the primary antibodies indicated in Table S2 in a solution with 2% BSA in TBST. After three washes with TBST, the membranes were incubated with 1:10000 anti-rabbit, mouse or goat IgGs conjugated with horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch™) in 2% BSA and 2% milk in TBST for 60 min at RT, washed with TBST, and developed with Clarity™ ECL Western Blotting Substrate (Bio-Rad) and detected in a chemiluminescent imaging system (MicroChemi 4.2, Berthold Technologies). Minor adjustments of brightness were performed with Adobe Photoshop CS5.

Immunofluorescence analyses and imaging. H-RPE cells were fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% during 10 minutes at 4°C. For RPE Flat Mounts preparation, after the eyes were extracted the cornea, lens and retina were removed and RPE and choroid were fixed by immersion for 10 min in PFA 4% at 4 °C in the case of RPE cells changes analyses, or immersed for 2 hours in PFA 4% at 4 °C and then the retina removed for those destined to the analyses of the subretinal microglia. For retina cryosections, after the eyes were dissected out, they were fixed for 2 hours in PFA 4% at 4 °C and then the cornea and lens removed, the eyeballs cryoprotected in graded series of sucrose, included in Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura) and kept at -20 °C until sectioning. Tissue sections of 14 µm were obtained with a cryostat (Microm HM560, Thermo Scientific), and collected in Superfrost Ultra Plus® (ThermoFisher Scientific) slides and kept at -20 °C until their use.

Following this cells and tissues were permeabilized with 0.2% PBS-Triton X-100 (Tx), blocked for 1 h in a solution with 1% BSA and 5% normal serum in 0.2% PBS-Tx and then incubated ON at 4°C in a solution containing 1% BSA and 2% normal serum in 0.2% PBS-Tx and the primary antibodies indicated in Table S2. Then, were washed with 0.2% PBS-Tx and incubated for 1h at room temperature with 1:750 Alexa fluor 488 and/or 1:750 Alexa fluor 555 fluorescent secondary antibodies (Life Technologies™) and the nuclear-staining TOPRO-3 (Life Technologies™, 1:1000) or DAPI (Sigma-Aldrich™, 1:10000) in 1% BSA and 5% normal serum in 0.2%PBS-Tx. Finally cells were washed with 0.2% PBS-Tx and PBS and then Transwell® membranes and Flat Mounts were placed in a slide with cells facing the cover slip and mounted using Prolong™ Gold antifading reagent (Life Technologies™).

Confocal images were obtained with a light microscope (Axio Observer Z1, Zeiss) and a laser scanning spectral confocal microscope (Leica TCS SP2) with the pinhole set at 1.0 Airy Units and 40x and 63x immersion oil objectives. 488nm, 543nm and 633nm laser lines were used to excite the Alexa 488, Alexa 555 and TOPRO3 fluorochromes respectively, and the three different channels were captured in sequential

mode. Epifluorescence images were obtained with a Time-Lapse (Zeiss) microscope. Proliferation counting was performed with Image-based Tool for Counting Nuclei (ITCN) for ImageJ software and microglial cells counting with Cell Counter tool for ImageJ. Minor adjustments of contrast and brightness were performed with Adobe® Photoshop® CS5 EXTENDED software and Leica Confocal Software.

Electron microscopy analyses. H-RPE cells were fixed with 2 % paraformaldehyde and 2 % glutaraldehyde in 0,1M cacodylate buffer pH 7,4 for 24 h at 4 °C and post-fixed during 2 hours in darkness with 1 % OsO₄ (v/v) and 1 % K₃Fe(CN)₆ (v/v) diluted in ultrapure water. After that, cells were washed with distilled water and dehydrated using a graded series of ethanol and a final step in propylene oxide before the infiltration in resin. Following, samples were embedded in Epoxy EMBED-812 resin (Electron Microscopy Sciences), ultrathin section obtained with an ultramicrotome Ultracut E (Reichert/Leica), contrasted with uranyl acetate and lead citrate and analyzed using a JEOL JEM-1011 HR electron microscope with a CCD Gatan ES1000W camera with iTEM software. Minor adjustments of contrast and brightness were performed with Adobe® Photoshop® CS5 EXTENDED software and Leica Confocal Software. Height and length measurements were done with ImageJ software.

Statistical analyses. All statistical analyses were performed with SPSS® Statistics 20.0 software. Significance differences between groups was evaluated by the parametric Student's t-test or ANOVA, and Bonferroni's post-hoc test, or the non-parametric Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test. The difference was considered significant when $p < 0.05$ and indicated by *, and highly significant if $p < 0.01$ and indicated by **. Non-significant differences were indicated by ns.

Figures and Tables

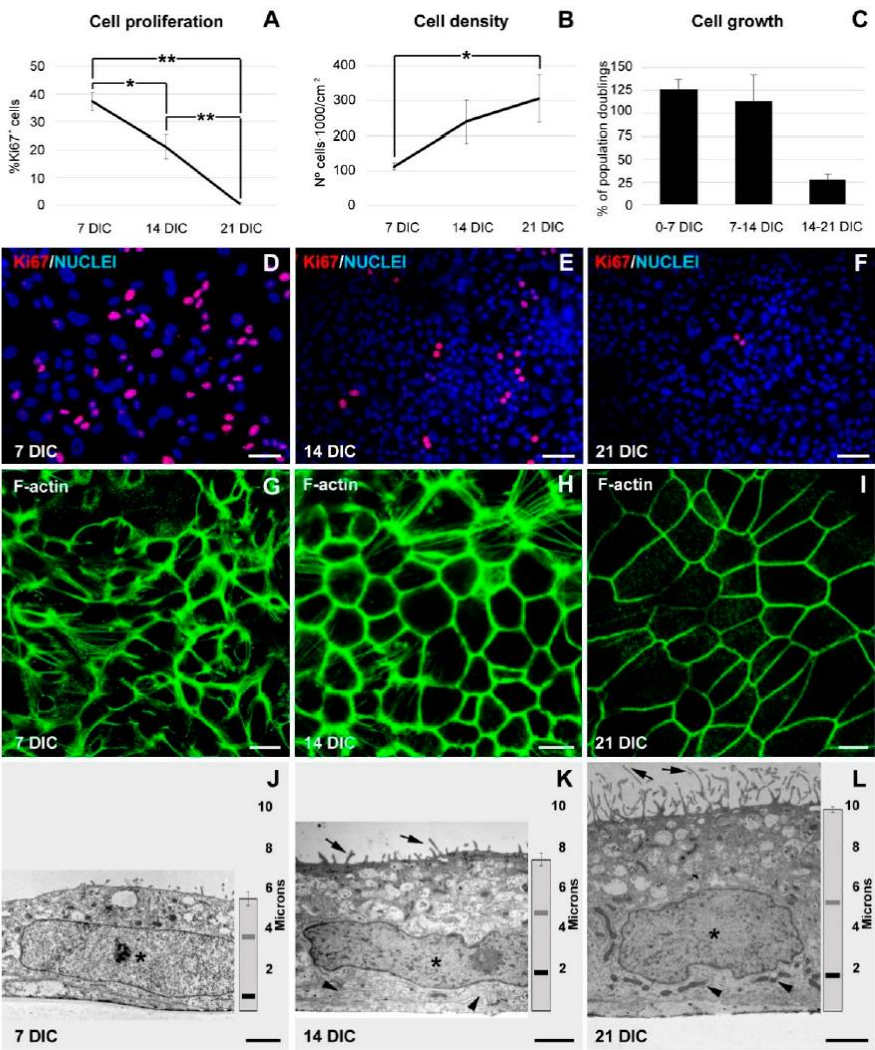


Figure 1. H-RPE cells polarize and differentiate within 21 days in culture (DIC). Graphical representation of the highly significant decrease in the number of proliferating cells through time (A), the significant increase in cell density (B) and the decrease in percentage of cell population doubling (C) at 7, 14 and 21 days of the H-RPE cells culture. (D-F) Epifluorescence images of H-RPE cells that show nuclei labeled with DAPI in blue and proliferating cells labeled with Ki67 in red at 7, 14 and 21 DIC. (G-I) Confocal microscopy images of F-actin showing the development of the actin belt adjacent to the plasma membrane from 7 to 14 and 21 DIC. (J-L) Electron microscopy images of the RPE cells at 7, 14 and 21 DIC, showing the position of the nuclei (Asterisk

in J-L), basal labyrinth (Arrowhead in K) and mitochondria (Arrowhead in L), growth of apical microvilli (Arrows in K and L), as well as the increase in cell height over time (vertical graph bar on the right side of each picture). Data in (A-C, J-L) is represented as mean \pm SEM. * in (A and B) $p < 0.05$. ** in (A) $p < 0.01$. Scale bars in (D-F): 50 μm ; (G-I): 10 μm ; (J-L): 2 μm . Vertical bar in (J-L): medium height of the cells. Grey horizontal bar in (J-L): relative position of the top of the nucleus. Black horizontal bar in (J-L): relative position of the bottom of the nucleus.

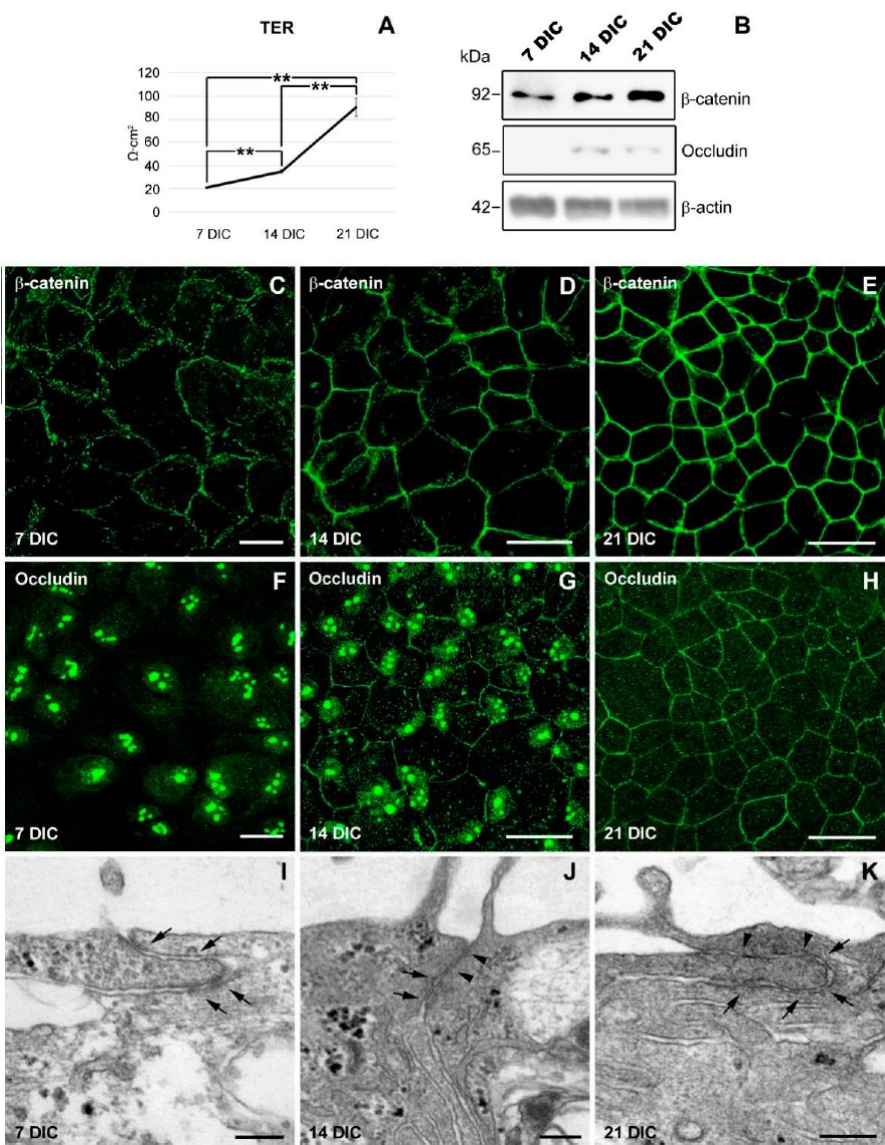


Figure 2. H-RPE cells establish a mature junctional complex within 21 days in culture (DIC). (A) Graphical representation of the highly significant increase of TER of the H-RPE cells from 7 to 14 and 21 DIC. (B) Western blot analyses showing that the adherens junction protein β -catenin is expressed from 7 DIC forward and tight junctions protein Occludin from 14 DIC onwards in H-RPE cells in culture. β -actin was used as loading control. (C-E) Confocal microscopy images of β -catenin location at the cell membrane in H-RPE cells in culture at 7, 14 and 21 DIC. (F-H) Confocal microscopy images of Occludin location at the cell membrane in H-RPE cells in culture at 14 and 21 DIC and nuclear unspecific labelling at 7 DIC. (I-K) Electron microscopy micrographs showing that adherens junctions are present from 7 DIC onwards (arrows in I-K), and tight junctions are present from 14 DIC onwards (Arrowheads in J and K) in H-RPE cells in culture. Data in (A) is represented as mean \pm SEM. ** in (A) $p < 0.01$. Scale bars in (C-H): 25 μm ; (I-K): 200 nm.

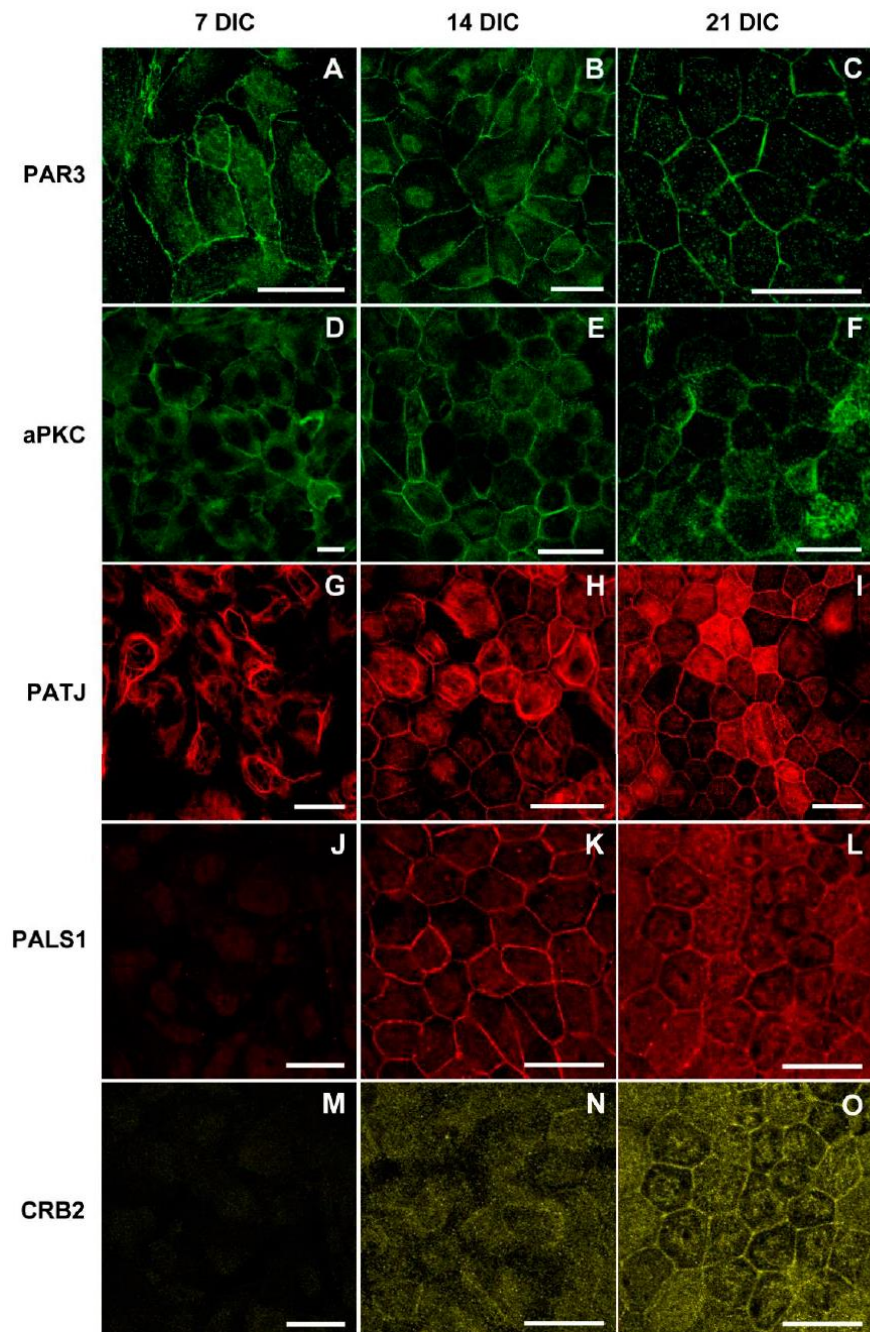


Figure 3. Analysis of apical polarity complex proteins expression and location during H-RPE cells culture development. See also Figure S1. Confocal microscopy images showing the localization of the Par complex proteins Par3 (A-C) and aPKC (D-F) at the

plasma membrane of H-RPE cells in culture at 7, 14 and 21 DIC. (G-I) Crb complex protein PATJ is expressed from 7 DIC but localizes at the plasma membrane from 14 DIC onwards. (J-L) Crb complex protein PALS1 is expressed and localized at the cell membrane from 14 DIC and hereafter. (M-O) Crb complex protein CRB2 is expressed from 14 DIC but localizes at the plasma membrane at 21 DIC. Scale bars: 25 μ m.

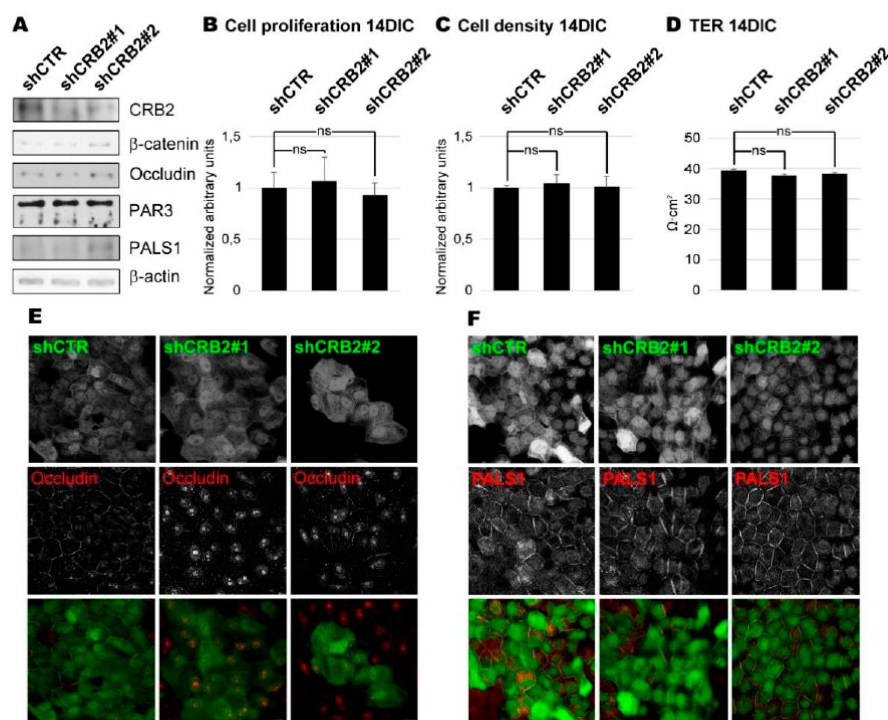


Figure 4. Analyses of the effects of CRB2 knockdown on H-RPE cells at 14 DIC. (A) Analyses by Western blot of CRB2 knockdown with shCRB2#1 and shCRB2#2 showing that the expression levels of the adherens junctions protein β-catenin, the tight junction protein Occludin, the Par complex protein PAR3 and the Crb complex protein PALS1 are not altered at 14 DIC. (B) Bar graphs shows that there is not any significant difference on the number of proliferating cells nor cell density (C) or TER (D) when infected with shCTR or shCRB2#1 and shCRB2#2. CRB2 knockdown neither affect to Occludin (E-G'') nor PALS1 (H-J'') localization when compared to shCTR infected cells. Error bars in (B-D): standard error of the mean. ns in (B-D) $p > 0.05$. Scale bars in (E-J''): 10 μ m.

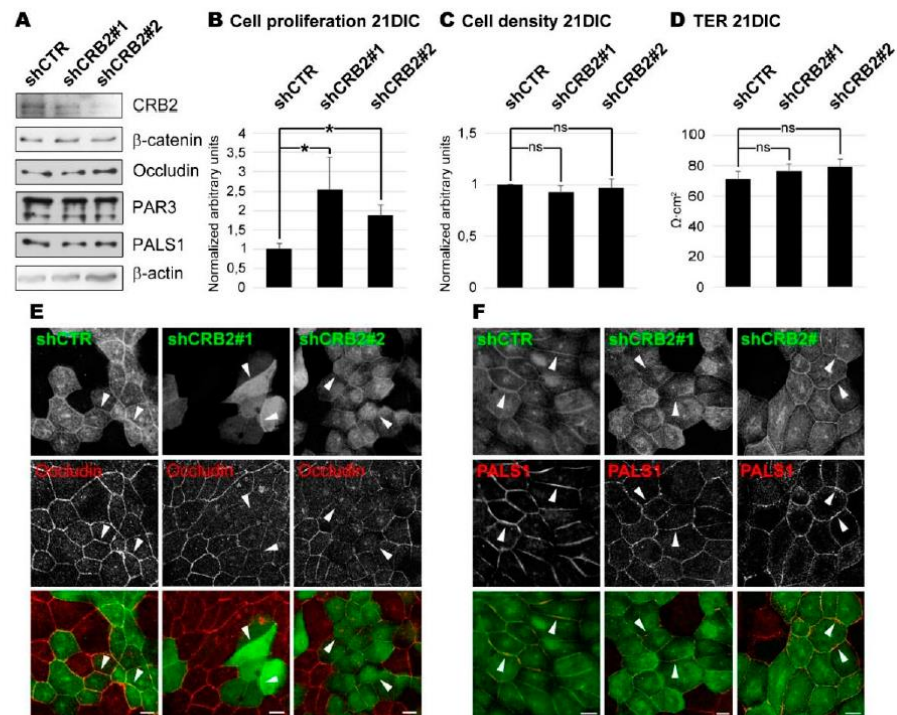


Figure 5. Analyses of the effects of CRB2 knockdown on H-RPE cells at 21 DIC. (A) Western blot analyses of CRB2 knockdown with shCRB2#1 and shCRB2#2 showing that the expression levels of the adherens junctions protein β -catenin, the tight junction protein Occludin, the Par complex protein PAR3 and the Crb complex protein PALS1 are not altered at 21 DIC. (B) Bar graphs demonstrate that there is a significant increase in the number of proliferating cells when CRB2 is silenced with shCRB2#1 or shCRB2#2 compared to shCTR infected cells but not in cell density (C) nor in TER (D) at this time point. CRB2 silenced cells show a disruption of Occludin (E) and PALS1 (F) labeling at the cell membrane when compared to shCTR infected cells. Error bars in (B-D): standard error of the mean. * in (B) $p < 0.05$. ns in (C-D) $p > 0.05$. Scale bars in (E-J'): 10 μ m.

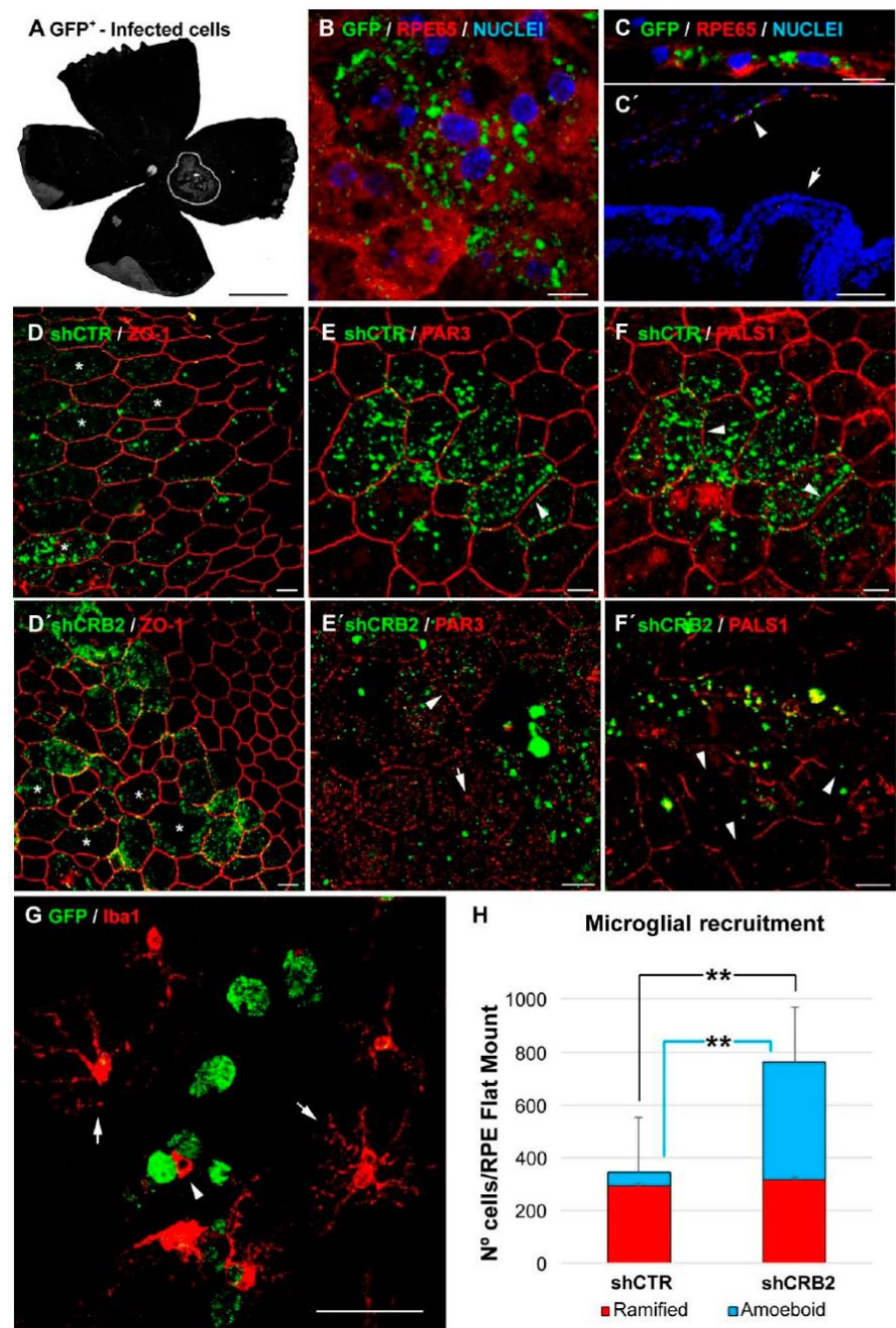


Figure 6. Analyses of the effects of CRB2 knockdown in the RPE cells in vivo. (A) Representative epifluorescence image of a Flat Mount 60 days after injection where the infection area is surrounded by white dots. (B) Confocal microscopy image of infected

GFP⁺ cells in a Flat Mount where the RPE specific protein RPE65 has been labeled in red and nuclei in blue. **(C and C')** Confocal microscopy image of infected GFP⁺ cells in a retinal cryosection where RPE65 labeling (red) shows that the infected cells are only RPE cells (Arrowhead in C') and not the neural retina (C and Arrow in C'). **(D and D')** Confocal microscopy images of RPE cells in a Flat Mount showing that CRB2 knockdown does not alter the ZO-1 expression or location but produces modifications in the morphology RPE cells (Asterisks in D and D'). **(E and E')** Confocal microscopy images of RPE cells in a Flat Mount showing that PAR3 location changes from a continuous and broad labeling of the plasma membrane on shCTR infected cells (Arrowhead in E) to a scarce and scattered labeling of the plasma membrane (Arrowhead in E') and cytoplasm (Arrow in E') in CRB2 knockdown cells. **(F and F')** Confocal microscopy images of RPE cells in a Flat Mount showing that PALS1 location changes from a continuous labeling of the plasma membrane on shCTR infected cells (Arrowhead in F) to an interrupted and patchy labeling of the plasma membrane in shCRB2 infected cells (Arrow in F'). **(G)** Confocal microscopy images of a Flat Mount where infected GFP⁺ RPE cells are surrounded by Iba1⁺ ramified (Arrows in G) and amoeboid (Arrowhead) microglial cells. **(H)** Bar graph showing that there is a significant increase in the number of total as well as in amoeboid but not in ramified microglial cells in the subretinal space of shCRB2 infected RPEs when compared to shCTR. Scale bars in **(A)**: 1 mm; **(B-C; D-F')**: 10 μ m; **(C' and G)**: 50 μ m. Error bars in **(H)**: standard error of the mean. ** in **(H)** $p < 0.01$.

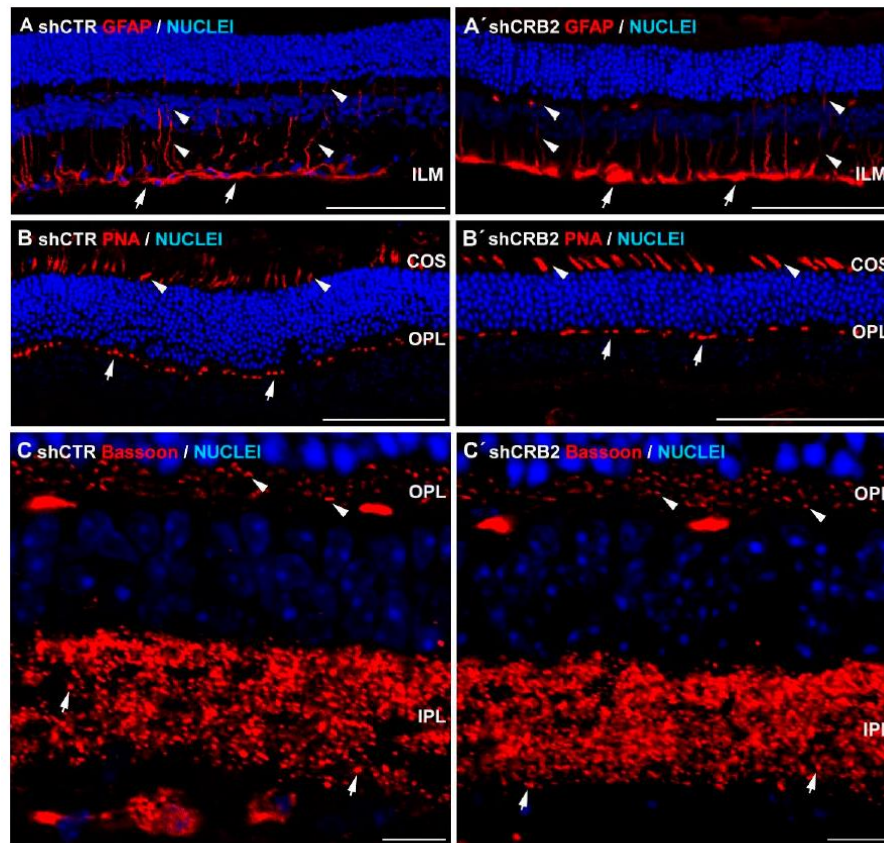


Figure 7. Analyses of the effects of CRB2 knockdown in the neural retina. Confocal images of neural retinas showing that there are not differences in the distribution of GFAP in the retinas of RPE infected with shCTR (A) or shCRB2 (A'), that mainly localizes at inner limiting membrane (ILM) (Arrows in A and A'), but also in some inner processes (Arrowheads in A and A'). There are neither differences in the cones outer segments (COS) (Arrowheads in B and B'), nor in cone pedicles (Arrows in B and B') labeled with PNA of shCTR (B) or shCRB2 (B) infected RPE. There are no differences in the synapses, labeled with Bassoon, in the retinas where the RPE was infected with shCTR (C) or shCRB2 (C'), in the outer plexiform layer (Arrowheads in C and C') nor in the inner plexiform layer (Arrows in C and C'). Scale bars: (A-B'): 100 μ m; (C, C'): 10 μ m.

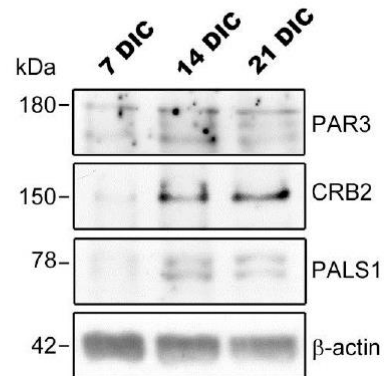


Figure S1. Related to Figure 3. Analysis of the expression of apical polarity complex proteins during H-RPE cells culture development. Western blot analysis showing that the Par complex protein PAR3 is expressed from 7 DIC onwards and Crb complex proteins CRB2 and PALS1 from 14 DIC onwards. B-actin is used as loading control.

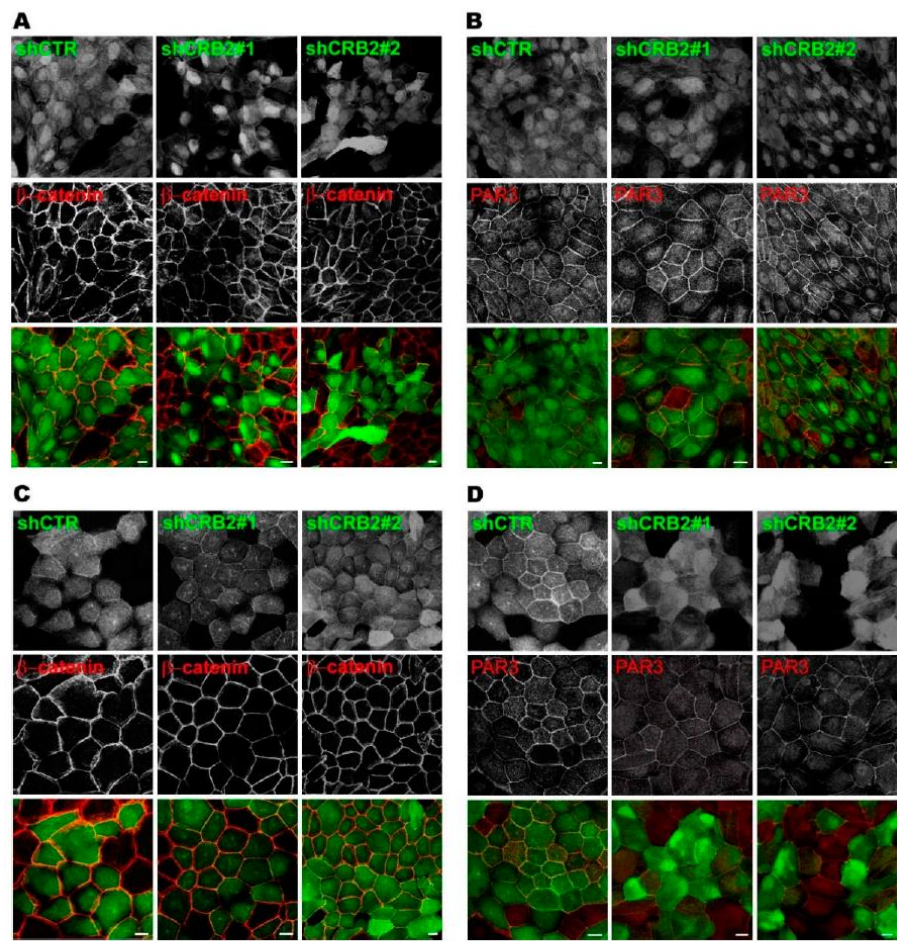


Figure S2. Related to Figures 4 and 5. Analyses of the effects of CRB2 knockdown on the expression and location of β -catenin and PAR3. The expression and location of the adherens junction protein β -catenin is not affected by CRB2 knockdown at 14 (A) nor at 21 DIC (C). Neither the expression nor location of the Par complex protein PAR3 is affected by CRB2 knockdown at 14 (B) nor at 21 DIC (D). Scale bars: 10 μ m.

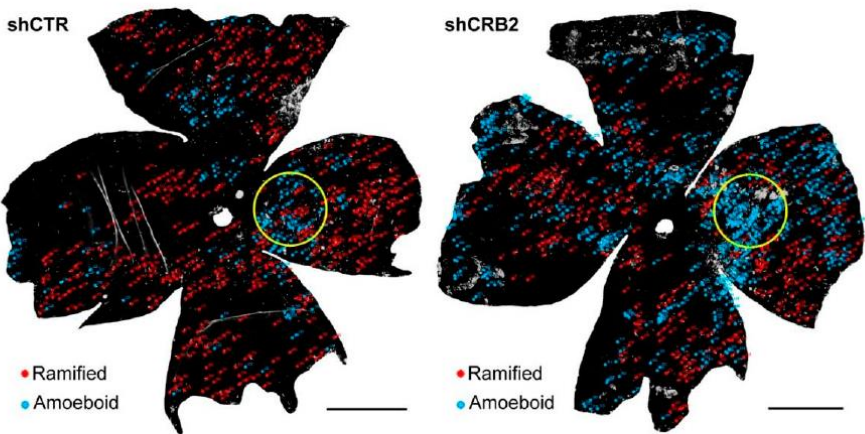


Figure S3. Related to Figure 6. Representative images of the quantification of microglial cells in infected RPE Flat Mounts. The number of ramified microglial cells (in red) is similar in the shCTR infected and shCRB2 infected RPE, but there are more amoeboid cells (in blue) when CRB2 is knocked-down, especially in the infection area (yellow circle). Scale bars: 1 mm

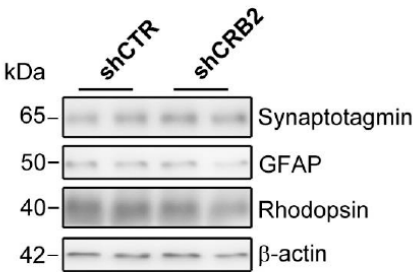


Figure S4. Related to Figure 7. Analysis by Western blot of the expression of some retinal proteins after shRNAs' injection. The protein levels of a marker of the glial reaction, GFAP, rods outer segment marker, Rhodopsin, and synapses marker Synaptotagmin are similar in the retinas of both shCTR and shCRB2 infected RPE.

shRNA	Species	Sequence
shCONTROL	<i>E. gracilis</i>	5'-cgcgGCGCGCTTTGTAGGATTCGttcaagagaCGAATCCTACAAAGCGCGCttttggaat-3'
shCRB2	<i>M. musculus</i>	5'-cgcgTCGAAGTGGATGAGGACGAAttcaagagaTTCGTCCTCATCCACTTCGttttggaat-3'
shCRB2#1	<i>H. sapiens</i>	5'-cgcgTCGCAATGACACCAAGGAAAttcaagagaTTTCCTTGGTGTCATTGCGttttggaat-3'
shCRB2#2	<i>H. sapiens</i>	5'-cgcgGTGGATCTGTGGACTCATTtcaagagaAATGAGTCCACAGATCCACTttttggaat-3'

Table S1. Sequences cloned into pLVTHM vectors and used in silencing experiments.

Antibodies and fluorescent molecules	Source	Catalog number	WB	Flat mount	Cell culture	Cryosections
aPKC	Santa Cruz Biotechnologies	sc-216			1/100	
Basson	Enzo Biochem	SAP7F407				1/5000
CRB2	Home-made		5 µg/ml			
CRB2	ThermoFisher scientific	PA5-25628			1/100	
DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)	Sigma Aldrich	D9542			1/10000	
Phalloidin-FITC	Sigma Aldrich	P5282		1/500	1/500	
GFAP	Sigma Aldrich	G6171	1/1000			1/1000
Iba1	Wako Pure Chemical Industries	019-19741		1/750		
Ki67	Abcam	ab15580			1/250	
Occludin	ThermoFisher scientific	71-1500	1/200		1/500	
PALS1	Abnova	H00064398-A01		1/250	1/250	
PALS1	Millipore	07-708	1/1000			
PAR3	Millipore	07-330	1/500	1/250	1/250	
PATJ	Abcam	ab102113			1/200	
PNA-FITC	Sigma Aldrich	L7381				1/500
RPE65	Abcam	ab13826		1/1000		1/1000
Synaptotagmin	BD	610433	1/1000			
TO-PRO® 3-Iodide	ThermoFisher scientific	T3605		1/1000		1/1000
ZO-1	ThermoFisher scientific	33-9100		1/100		
β-actin	Sigma Aldrich	A5441	1/5000			
β-catenin	BD Biosciences	610154			1/250	
β-catenin	Santa Cruz Biotechnologies	sc-1496	1/100			

Table S2. Antibodies and fluorescent molecules employed in the study. The name of the antigen, the source and catalog number of the antiserum, as well as the concentration and the technique used are indicated on this table.

References

1. Nelson WJ. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 422, 766-774 (2003).
2. Arimura N, Kaibuchi K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 194-205 (2007).
3. St Johnston D, Ahringer J. Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell* 141, 757-774 (2010).
4. Knoblich JA. Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 849-860 (2010).
5. Rodriguez-Boulan E, Macara IG. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 225-242 (2014).
6. Johnson K, Wodarz A. A genetic hierarchy controlling cell polarity. *Nat Cell Biol* 5, 12-14 (2003).
7. Ellenbroek SI, Iden S, Collard JG. Cell polarity proteins and cancer. *Semin Cancer Biol* 22, 208-215 (2012).
8. Assemet E, Bazellieres E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D. Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* 1778, 614-630 (2008).
9. Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127, 2525-2532 (2007).
10. Wang Q, Margolis B. Apical junctional complexes and cell polarity. *Kidney Int* 72, 1448-1458 (2007).
11. McCaffrey LM, Macara IG. Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 21, 727-735 (2011).
12. Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 17, 453-458 (2005).
13. Martin-Belmonte F, Perez-Moreno M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 23-38 (2012).
14. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85, 845-881 (2005).
15. Marmorstein AD. The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic* 2, 867-872 (2001).


16. Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med* 10, 802-823 (2010).
17. Nguyen MM, Rivera C, Griep AE. Localization of PDZ domain containing proteins Discs Large-1 and Scribble in the mouse eye. *Mol Vis* 11, 1183-1199 (2005).
18. Vieira V, et al. Differential regulation of Dlg1, Scrib, and Lgl1 expression in a transgenic mouse model of ocular cancer. *Mol Vis* 14, 2390-2403 (2008).
19. Cui S, Otten C, Rohr S, Abdellah-Seyfried S, Link BA. Analysis of aPKClambda and aPKCzeta reveals multiple and redundant functions during vertebrate retinogenesis. *Mol Cell Neurosci* 34, 431-444 (2007).
20. Luo Y, Fukuhara M, Weitzman M, Rizzolo LJ. Expression of JAM-A, AF-6, PAR-3 and PAR-6 during the assembly and remodeling of RPE tight junctions. *Brain Res* 1110, 55-63 (2006).
21. van de Pavert SA, et al. Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *J Cell Sci* 117, 4169-4177 (2004).
22. Park B, et al. PALS1 is essential for retinal pigment epithelium structure and neural retina stratification. *J Neurosci* 31, 17230-17241 (2011).
23. Paniagua AE, et al. CRB2 completes a fully expressed Crumbs complex in the Retinal Pigment Epithelium. *Sci Rep* 5, 14504 (2015).
24. Bazellieres E, Assemet E, Arsanto JP, Le Bivic A, Massey-Harroche D. Crumbs proteins in epithelial morphogenesis. *Front Biosci* 14, 2149-2169 (2009).
25. Alves CH, et al. Loss of CRB2 in the mouse retina mimics human retinitis pigmentosa due to mutations in the CRB1 gene. *Hum Mol Genet* 22, 35-50 (2013).
26. den Hollander AI, et al. Mutations in a human homologue of Drosophila crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet* 23, 217-221 (1999).
27. Fogg VC, Liu CJ, Margolis B. Multiple regions of Crumbs3 are required for tight junction formation in MCF10A cells. *J Cell Sci* 118, 2859-2869 (2005).
28. Lemmers C, et al. CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell* 15, 1324-1333 (2004).
29. Roh MH, Fan S, Liu CJ, Margolis B. The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Sci* 116, 2895-2906 (2003).
30. Xiao Z, et al. Deficiency in Crumbs homolog 2 (Crb2) affects gastrulation and results in embryonic lethality in mice. *Dev Dyn* 240, 2646-2656 (2011).
31. Whiteman EL, et al. Crumbs3 is essential for proper epithelial development and viability. *Mol Cell Biol* 34, 43-56 (2014).
32. Charrier LE, Loie E, Laprise P. Mouse Crumbs3 sustains epithelial tissue morphogenesis in vivo. *Sci Rep* 5, 17699 (2015).
33. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31, 13-20 (1983).
34. Miyoshi J, Takai Y. Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778, 670-691 (2008).
35. Li L, Eter N, Heiduschka P. The microglia in healthy and diseased retina. *Exp Eye Res* 136, 116-130 (2015).
36. Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Sarthy PV. Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25, 1321-1328 (1984).
37. Jones BW, Marc RE. Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp Eye Res* 81, 123-137 (2005).
38. Straight SW, et al. Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol Biol Cell* 15, 1981-1990 (2004).
39. Shin K, Straight S, Margolis B. PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol* 168, 705-711 (2005).

40. Alves CH, et al. Targeted ablation of Crb2 in photoreceptor cells induces retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 23, 3384-3401 (2014).
41. Boroviak T, Rashbass P. The apical polarity determinant Crumbs 2 is a novel regulator of ESC-derived neural progenitors. *Stem Cells* 29, 193-205 (2010).
42. Bonilha VL. Retinal pigment epithelium (RPE) cytoskeleton in vivo and in vitro. *Exp Eye Res* 126, 38-45 (2014).
43. Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 225-236 (2003).
44. Rizzolo LJ, Peng S, Luo Y, Xiao W. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res* 30, 296-323 (2011).
45. Liao JL, et al. Molecular signature of primary retinal pigment epithelium and stem-cell-derived RPE cells. *Hum Mol Genet* 19, 4229-4238 (2010).
46. Bacallao R, et al. The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J Cell Biol* 109, 2817-2832 (1989).
47. Harris TJ, Peifer M. Adherens junction-dependent and -independent steps in the establishment of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* 167, 135-147 (2004).
48. Harris TJ, Peifer M. The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J Cell Biol* 170, 813-823 (2005).
49. Coopman P, Djiane A. Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. *Cell Mol Life Sci*, (2016).
50. Green KJ, Getsios S, Troyanovsky S, Godsel LM. Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000125 (2010).
51. Xiao H, Liu M. Atypical protein kinase C in cell motility. *Cell Mol Life Sci* 70, 3057-3066 (2013).
52. McCaffrey LM, Macara IG. Signaling pathways in cell polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, (2012).
53. Shin K, Wang Q, Margolis B. PATJ regulates directional migration of mammalian epithelial cells. *EMBO Rep* 8, 158-164 (2007).
54. Wells CD, et al. A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell* 125, 535-548 (2006).
55. Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B. The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *J Biol Chem* 277, 27501-27509 (2002).
56. Adachi M, et al. Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight-junction proteins. *Mol Cell Biol* 29, 2372-2389 (2009).
57. Wang Q, Chen XW, Margolis B. PALS1 regulates E-cadherin trafficking in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell* 18, 874-885 (2007).
58. Assemet E, et al. The multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) expression regulates cellular levels of the PALS-1/PATJ polarity complex. *Exp Cell Res* 319, 2514-2525 (2013).
59. Slavotinek A, et al. CRB2 mutations produce a phenotype resembling congenital nephrosis, Finnish type, with cerebral ventriculomegaly and raised alpha-fetoprotein. *Am J Hum Genet* 96, 162-169 (2015).
60. Ebarasi L, et al. Defects of CRB2 Cause Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Am J Hum Genet* 96, 153-161 (2015).
61. Schluter MA, et al. Trafficking of Crumbs3 during cytokinesis is crucial for lumen formation. *Mol Biol Cell* 20, 4652-4663 (2009).
62. Chen X, Macara IG. Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat Cell Biol* 7, 262-269 (2005).
63. Fan S, et al. A novel Crumbs3 isoform regulates cell division and ciliogenesis via importin beta interactions. *J Cell Biol* 178, 387-398 (2007).
64. Katoh M. Identification and characterization of Crumbs homolog 2 gene at human chromosome 9q33.3. *Int J Oncol* 24, 743-749 (2004).

65. Mojallal M, *et al.* AmotL2 disrupts apical-basal cell polarity and promotes tumour invasion. *Nat Commun* 5, 4557 (2014).
66. Medina E, Lemmers C, Lane-Guermontprez L, Le Bivic A. Role of the Crumbs complex in the regulation of junction formation in *Drosophila* and mammalian epithelial cells. *Biol Cell* 94, 305-313 (2002).
67. Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG, Margolis B. Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol* 5, 137-142 (2003).
68. Mao X, *et al.* Cell polarity protein CRB3 is an independent favorable prognostic factor for clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 46, 657-666 (2015).
69. Karp CM, *et al.* Role of the polarity determinant crumbs in suppressing mammalian epithelial tumor progression. *Cancer Res* 68, 4105-4115 (2008).
70. Loie E, Charrier LE, Sollier K, Masson JY, Laprise P. CRB3A Controls the Morphology and Cohesion of Cancer Cells through Ehm2/p114RhoGEF-Dependent Signaling. *Mol Cell Biol* 35, 3423-3435 (2015).
71. Herranz H, Stamatakis E, Feiguin F, Milan M. Self-refinement of Notch activity through the transmembrane protein Crumbs: modulation of gamma-secretase activity. *EMBO Rep* 7, 297-302 (2006).
72. Mitsuishi Y, *et al.* Human CRB2 inhibits gamma-secretase cleavage of amyloid precursor protein by binding to the presenilin complex. *J Biol Chem* 285, 14920-14931 (2010).
73. Richardson EC, Pichaud F. Crumbs is required to achieve proper organ size control during *Drosophila* head development. *Development* 137, 641-650 (2010).
74. Szymaniak AD, Mahoney JE, Cardoso WV, Varelas X. Crumbs3-Mediated Polarity Directs Airway Epithelial Cell Fate through the Hippo Pathway Effector Yap. *Dev Cell* 34, 283-296 (2015).
75. Varelas X, *et al.* The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway. *Dev Cell* 19, 831-844 (2010).
76. Dong J, *et al.* Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 130, 1120-1133 (2007).
77. Pierfelice T, Alberi L, Gaiano N. Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks. *Neuron* 69, 840-855 (2011).
78. Pellissier LP, *et al.* CRB2 acts as a modifying factor of CRB1-related retinal dystrophies in mice. *Hum Mol Genet* 23, 3759-3771 (2014).
79. Pellissier LP, *et al.* Targeted ablation of CRB1 and CRB2 in retinal progenitor cells mimics Leber congenital amaurosis. *PLoS Genet* 9, e1003976 (2013).
80. Mehalow AK, *et al.* CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Hum Mol Genet* 12, 2179-2189 (2003).
81. Kim S, *et al.* The apical complex couples cell fate and cell survival to cerebral cortical development. *Neuron* 66, 69-84 (2010).
82. Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 77, 8957-8961 (2003).

3. Conclusions

- 1- The H-RPE cell culture established in this work happened to be an excellent model for the study of the epithelial cell biology in general and especially, of the RPE, as it is of easy acquisition and culture, and cells show features of a highly polarized and differentiated epithelia.
- 2- The antibody designed against CRB2 is a useful tool for the study of both, the human and murine CRB2 protein and, to date, is the only antibody that specifically recognizes this protein not only by immunofluorescence but by Western blot analyses.
- 3- CRB2 is the only CRB isoform that has been detected in the RPE to date. In this tissue, CRB2 completes the establishment of the Crb complex at the tight junctions during apicobasal polarization, where it regulates cell differentiation by the stabilization of the tight junctions and Crb complex and by facilitating the cell cycle arrest.
- 4- CRB2 is essential for the maintenance of the RPE cell's homeostasis, as defects in this protein causes morphological and molecular defects in these cells leading to a recruitment of activated microglial cells at the subretinal space that could affect the retinal function.
- 5- CRB2 is a key protein for the development of the epithelial phenotype, characterized by its apicobasal polarity and differentiated status. The lack of CRB2 in mature RPE cells affects to these features, so it is essential for the performance of the RPE functions. Therefore, CRB2 defects could trigger the emergence of pathologies of epithelial origin, as different type of tumors or, in the eye, Age-related Macular Degeneration.



CRB2 es una proteína fundamental para el desarrollo del fenotipo epitelial, ya que regula la estabilidad de las uniones ocuyentes y del complejo de polaridad Crb, así como la diferenciación de las células epiteliales, por lo que CRB2 resulta esencial para el mantenimiento de la homeostasis del epitelio pigmentario de la retina.